



Медицински университет – Плевен

Факултет „Фармация“

Катедра „Медицинска генетика“

Д-р Славена Енкова Николова

**Генетичен скрининг за чести моногенни дефекти сред
двойки предрепродуктивно**

**– проучване на честотата, рисковете за репродукция и
възможностите за генетична профилактика**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

**на дисертационен труд за придобиване на
образователна и научна степен**

„Доктор“

Докторска програма: Медицинска генетика

Научен ръководител – проф. д-р Катя Стефанова Ковачева, д.м.

Плевен, 2026

Медицински университет – Плевен

Факултет „Фармация“

Катедра „Медицинска генетика“

Д-р Славена Енкова Николова

**Генетичен скрининг за чести моногенни дефекти сред двойки
предрепродуктивно**

**– проучване на честотата, рисковете за репродукция и възможностите
за генетична профилактика**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

**на дисертационен труд за придобиване на образователна и
научна степен
„Доктор“**

Докторска програма: Медицинска генетика

Научен ръководител – проф. д-р Катя Стефанова Ковачева, д.м.

Научно жури:

Проф. д-р Савина Петрова Хаджидекова, д.м.

Проф. Алексей Славков Савов, д.б.н.

Доц. д-р Борислав Николов Попов, д.м.

Доц. д-р Никола Калинов Поповски, д.м.

Доц. д-р Добринка Христова Гинчева, д.м.

Плевен, 2026

С благодарност към д-р Зорница Камбурова за нейната подкрепа и ценни насоки в процеса на разработване на настоящия труд.

Дисертационният труд е представен на 177 страници и съдържа 64 таблици, 14 фигури и 5 приложения. Библиографията обхваща 197 литературни източника, от които 195 на латиница и 2 на кирилица.

Настоящите изследвания са изцяло финансирани по проект BG05M2OP001-1.002-0010-C01 "ЦЕНТЪР ЗА КОМПЕТЕНТНОСТ ПО ПЕРСОНАЛИЗИРАНА МЕДИЦИНА, 3D И ТЕЛЕМЕДИЦИНА, РОБОТИЗИРАНА И МИНИМАЛНО ИНВАЗИВНА ХИРУРГИЯ" към оперативна програма „Наука и образование за интелигентен растеж“ и Европейския фонд за регионално развитие.

Авторът е докторант в редовна форма на обучение към катедра „Медицинска генетика“, факултет „Фармация“, Медицински университет – Плевен

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от катедра „Медицинска генетика“ към Медицински университет – Плевен, на разширен катедрен съвет, състоял се на 10.03.2026 г.

Състав на научно жури:

Председател:

Доц. д-р Никола Калинов Поповски, д.м.

Членове:

Проф. д-р Савина Петрова Хаджидекова, д.м.

Проф. Алексей Славков Савов, д.б.н.

Доц. д-р Борислав Николов Попов, д.м.

Доц. д-р Добринка Христова Гинчева, д.м.

Резервни членове:

Проф. д-р Иванка Исталианова Димова, д.м.н

Проф. д-р Тихомир Панков Тотев, д.м.

Защитата ще се състои на 12.05.2026 г. от 13:00 ч. в зала „Гален“ на Телекомуникационен Ендоскопски Център, Медицински университет – Плевен.

Материалите по защитата са на разположение в Научен отдел на факултет „Фармация“, МУ-Плевен и на сайта на университета – www.mu-pleven.bg

СЪДЪРЖАНИЕ

ВЪВЕДЕНИЕ	8
I. ЦЕЛ	9
II. ЗАДАЧИ	9
III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	10
1. Характеристика на изследваните индивиди.....	10
2. Основни методи, използвани в настоящото проучване.....	10
2.1 Медицинско интервю.....	10
2.2 Генеалогичен метод.....	11
2.3 Молекулярно-генетичен метод.....	11
2.3.1 Изолиране на ДНК.....	11
2.3.2. Масивно паралелно секвениране (секвениране от следващо поколение, NGS).....	11
2.3.3. Анализ на генерираните от секвенирането данни.....	11
2.4. Генетично консултиране.....	13
2.5. Статистическа обработка на данните.....	13
3. Методологични ограничения на използвания аналитичен подход.....	14
VI. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ	15
1. Количествена оценка на носителския товар – честота и среден брой носителства на патогенни варианти за рецесивни моногенни заболявания в изследваната кохорта от българската популация.....	15
2. Обща характеристика на гените с установено носителство и детайлен анализ на най-често засегнатите гени.....	17
2.1 Обща характеристика на засегнатите гени.....	17
2.2 Дефиниране и анализ на най-често засегнатите гени.....	20
3. Молекулно профилиране на патогенните варианти в най-често засегнатите гени.....	26
4. Оценка на двойки с потенциален репродуктивен риск и идентифициране на реално рисков двойки.....	29
4.1 Дефиниция на рискова двойка в настоящото проучване.....	29
4.2 Репродуктивна двойка № 1.....	29
4.3 Репродуктивна двойка № 2.....	30
4.4 Репродуктивна двойка № 3.....	31
4.5 Репродуктивна двойка № 4.....	33
4.6 Репродуктивна двойка № 5.....	34
4.7 Репродуктивна двойка № 6.....	34
4.8 Репродуктивни двойки № 7 и 8.....	36
4.9 Репродуктивна двойка № 9.....	36
4.10 Репродуктивни двойки № 10,11,12,13,14 и 15.....	37
4.11 Репродуктивна двойка № 16.....	38

4.12	Репродуктивна двойка № 17.....	38
4.13	Характеристика на групата на реално рисковите репродуктивни двойки.....	39
5.	Оценка на случаите с патогенни варианти, имащи отношение към личния здравен риск на носителите.....	42
5.1	Обща характеристика.....	42
5.2	Случаи с доказан личен здравен риск.....	43
5.3	Случаи с потенциален личен здравен риск.....	44
5.4	Случаи с условен личен здравен риск.....	44
5.4.1	Случаи с предразположение към онкологично заболяване.....	45
5.4.2	Условен риск за изява на доминантен фенотип, при носителство на патогенен вариант в ген за моногенно заболяване със смесен тип на унаследяване.....	46
6.	Изграждане на подход за генетично консултиране при разширен скрининг за носителство, насочен към оценка на репродуктивния риск при двойки и към интерпретация на находки, имащи отношение към личния здравен риск на носителя.....	48
6.1	Генетично консултиране при скрининг за носителство.....	48
6.2	Подход за генетично консултиране при разширен скрининг за носителство, насочен към репродуктивния риск на изследваната двойка.....	49
6.3	Подход за генетично консултиране при находки, свързани с личния здравен риск на изследвания индивид.....	52
	ОБОБЩЕНИЕ НА НАСТОЯЩОТО ПРОУЧВАНЕ.....	56
	V. ИЗВОДИ.....	58
	VI. ПРИНОСИ.....	60
	VII. ПУБЛИКАЦИИ И НАУЧНИ ПРОЯВИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	61

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ НА КИРИЛИЦА

АД – автозомно-доминантен

АР – автозомно-рецесивен

АРС – автозомно-рецесивно състояние

ГК – генетична консултация / генетично консултиране

МЗ – моногенно заболяване

ПВ – патогенен вариант

ПНД – пренатална диагностика

РД – рискова двойка

РР – репродуктивен риск

РС – рецесивно състояние

РСН – разширен скрининг за носителство

СН – скрининг за носителство

ХР – Х-рецесивен

ЧН – честота на носителство

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ НА ЛАТИНИЦА

ACMG/AMP – American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology

ClinVar – база данни за клинично значими генетични варианти

gnomAD – The Genome Aggregation Database

LOF – загуба на функция

NGS – секвениране от следващо поколение

PGT-M – предимплантационно генетично изследване за моногенни заболявания

WHO – Световна Здравна Организация

ВЪВЕДЕНИЕ

Моногенните заболявания (МЗ), които съставляващи приблизително 40% от редките болести, се утвърждават като значим медицински, социален и икономически проблем в съвременното здравеопазване. Въпреки ниската си индивидуална честота, те засягат съществен дял от населението и са свързани с висока заболеваемост, смъртност, хронично протичане и значително натоварване както за засегнатите семейства, така и за здравните системи. Особено място заемат рецесивните състояния (РС) – автозомно-рецесивни (АРС) и X-рецесивни състояния (ХРС), при които наличието на асимптоматични носители и универсалният носителски товар в човешката популация обуславят постоянен риск за раждане на засегнати деца, включително и при двойки без фамилна анамнеза.

Скринингът за носителство (СН) се утвърждава като най-ефективната стратегия за идентифициране на рискови репродуктивни двойки (РД) и за подпомагане на информирания репродуктивен избор. Историческият опит с таргетни, етнически базирани програми демонстрира висока ефективност при определени популации и заболявания, но същевременно разкрива съществени ограничения, свързани с намалена информативност при пан-етнически популации, риск от пропускане на значителен брой носители, трудности при определяне на етническа принадлежност, както и потенциал за стигматизация и дискриминация.

Развитието на високопроизводителните геномни технологии, и по-специално въвеждането на паралелното масово секвениране (секвениране от следващо поколение, NGS), създаде предпоставки за преход към разширен скрининг за носителство (РСН), с пан-етническо приложение. РСН предлага значително по-висока откриваемост на носители и РД, по-ниски остатъчни рискове при отрицателен резултат и по-справедлив достъп до скрининг. Универсалният характер на този подход допринася и за редуциране на психосоциалните рискове, включително стигматизацията, като нормализира носителството като често срещано явление в общата популация.

Изложените аргументи ни мотивираха да започнем настоящото проучване, базирано на проспективно проведен СН сред група репродуктивни двойки от българската популация.

I. ЦЕЛ

Да се определи честотата и профилът на носителство на патогенни варианти в гени, асоцииращи с рецесивни моногенни състояния, в група индивиди от българската популация, да се анализират произтичащите от тях репродуктивни рискове и да се разработи подход за генетично консултиране в контекста на резултатите от скрининга за носителство.

II. ЗАДАЧИ

1. Да се определи честота и среден брой носителства на патогенни варианти в гени, асоцииращи с рецесивни моногенни състояния в изследваната група индивиди от българската популация.
2. Да се установи профилът на засегнатите гени в изследваната кохорта.
3. Да се проучи молекулната характеристика на патогенните варианти, установени в най-често засегнатите гени.
4. Да се анализират потенциално рисковите двойки и да се идентифицират тези от тях с реален репродуктивен риск.
5. Да се анализират случаите с открити патогенни варианти в гени, които имат отношение към личния здравен риск на носителя.
6. Да се разработи комплексен подход за генетично консултиране, въз основа резултатите от разширения скрининг за носителство и находките, обвързани с репродуктивния риск на двойката и личния здравен риск на носителя.

III. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

1. Характеристика на изследваните индивиди

Обект на настоящия дисертационен труд са 150 репродуктивни двойки (300 индивида) от българската популация. Всички участници отговаряха на следните критерии за включване: репродуктивна възраст, предстояща или планирана репродукция, клинично здрави лица, без данни за лична и фамилна анамнеза за моногенни заболявания и без установено кръвнородство между партньорите.

От включените 150 двойки, 100 са без доказани репродуктивни неудачи. От тях 70 двойки към момента на вземане на кръвната проба не са реализирали репродукция и не са правили опити за забременяване; 9 двойки са с едно родено здраво дете; при 16 двойки жената партньор е с текуща бременност към момента на включване в изследването; при 5 двойки е налице едно родено здраво дете и текуща бременност. Двойките с текуща бременност са насочени към кабинет за генетична консултация (ГК) във връзка с провеждане на биохимичен серумен скрининг, в рамките на който им е предложено участие в настоящото изследване. Останалите двойки без репродуктивни неудачи са включени след изразено желание за участие, след публично обявяване на набирането на проби.

Останалите 50 репродуктивни двойки са с анамнеза за репродуктивни неудачи, без реализирана репродукция. Насочени са за ГК от акушер-гинеколог, като в рамките на консултацията им е предложено участие в дисертационното изследване.

Снемането на личната и фамилна анамнеза, както и вземането на биологичен материал (венозна кръв), бяха извършени от специалист по медицинска генетика в кабинета за медико-генетична консултация към УМБАЛ „Д-р Георги Странски“ ЕАД – гр. Плевен. Пробите бяха събирани в периода от януари 2020 г. до май 2024 г.

Всички участници бяха включени доброволно в изследването, след подписване на информирано съгласие, одобрено от Етичната комисия към МУ-Плевен.

2. Основни методи, използвани в настоящото проучване

2.1 Медицинско интервю – Личната анамнеза беше снета чрез целенасочено клинично интервю, проведено от лекар-генетик в рамките медико-генетична консултация.

2.2 Генеалогичен метод – На всички партньори от двойките, които отговаряха на предварителните критерии, беше изградено родословно дърво, обхващащо родственици от три/четири поколения на всеки от партньорите.

2.3 Молекулярно-генетичен метод – На всички изследвани индивиди беше взет биологичен материал – венозна кръв, около 5 мл събрана във вакутейнер с ЕДТА. Геномното изследване е проведено с методите на масивно паралелно секвениране (Next Generation Sequencing, NGS), в следните основни етапи:

2.3.1 Изолиране на ДНК – От събраната периферна венозна кръв беше изолирана геномна ДНК чрез автоматизиран метод, с използване на готов кит MagCore Genomic DNA Whole Blood kit (Ref: MGB400 02, RBC Bioscience), съгласно инструкциите на производителя. Надеждността и възпроизводимостта на използвания метод за изолиране на ДНК се удостоверяват чрез сертификат за качество, предоставен от фирмата доставчик на реактивите. След изолиране, получената ДНК беше съхранявана при температура $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ в ДНК банката на Центъра за компетентност „Леонардо да Винчи“ към МУ – Плевен.

2.3.2 Масивно паралелно секвениране (секвениране от следващо поколение, NGS) – Генетичният анализ на изолираната геномна ДНК беше проведен чрез методите на секвениране от следващо поколение (Next Generation Sequencing – NGS), които позволяват едновременното изследване на множество гени при голям брой проби. За подготовка на библиотеките беше използван таргетен панел TruSight One Expanded (Illumina©), който анализира екзоните и граничните екзон/интрон участъци на общо 6699 клинично значими гени. Поради своя обхват и таргетираност се дефинира като клиничен екзом и е подходящ за целите на пилотно проучване за СН. Подготовката на библиотеките беше извършена в съответствие с протокола на производителя. Получените библиотеки бяха секвенирани на платформа Illumina NextSeq 550 с конфигурация на прочита 2×150 b.p. Използваният метод позволява надеждно откриване на малки генетични изменения, включително еднуклеотидни варианти (SNV) и малки инсерции и делеции (indels), но не е информативен по отношение на големи геномни пренареждания.

2.3.3 Анализ на генерираните от секвенирането данни – Получените от изследваните проби ДНК фрагменти бяха сравнени с човешкия референтен геном hg19.

Генерираните изходни файлове във формат gVCF бяха обработени и анализирани с помощта на софтуерната платформа BaseSpace Variant Interpreter (Illumina®). За оптимизиране на анотацията и интерпретацията на вариантите бяха приложени предварително дефинирани персонализирани филтри, включващи минимална дълбочина на покритие от 20× за всеки вариант, както и изключване на варианти без установено клинично значение (*benign* и *likely benign*) и такива с неясно клинично значение (*VUS*).

Идентифицираните генетични варианти бяха класифицирани съгласно препоръките на Американския колеж по медицинска генетика и геномика (ACMG), позовавайки се на петстепенната система за оценка: патогенен (*pathogenic* – P), вероятно патогенен (*likely pathogenic* – LP), вариант с неясно клинично значение (*variant of uncertain significance* – VUS), вероятно бенигнен (*likely benign* – LB) и бенигнен (*benign* – B). Класификацията беше извършена въз основа на утвърдените критерии за патогенност, подробно представени в Таблица 1 .

Таблица 1. Критерии за патогенност на генетичните варианти според ACMG/AMP

Критерии за патогенност	Категория
Много силен	PVS1 – вариант водещ до LOF на белтъка (<i>nonsense, frameshift, canonical±1 or 2 splice sites, initiation codon, делеция на екзон/екзони</i>)
Силен	PS1 – аминокиселинна замяна, в място където преди това е докладван патогенен вариант
	PS2 – <i>de novo</i> вариант, доказан със сегрегационен анализ
Умерено-силен	PS3 – наличие на експериментални доказателства за патогенност на варианта
	PS4 – честотата на вариант в засегнати индивиди е по-висока от честота в здрави контроли
	PM1 – локализиран в гореща точка на патогенни варианти
	PM2 – липсва в здрави контроли, или е с изключително ниска честота
	PM3 – установен в <i>trans</i> с друг патогенен вариант (за рецесивни състояния)
	PM4 – водещ до промяна на дължината на протеина (за <i>in-frame</i> мутации) или удължаващи протеина варианти
Поддържащ	PM5 – нова аминокиселинна замяна в място, където е докладван патогенен вариант
	PM6 – предполагаем <i>de novo</i> вариант, без проведен сегрегационен анализ
	PP1 – ко-сегрегация със заболяване, при много засегнати родственици от една фамилия
	PP2 – <i>missense</i> вариант в ген с малко бенигнени <i>missense</i> варианти, в ген за който се знае, че <i>missense</i> варианти са патогенен механизъм
	PP3 – много компютърно обработени доказателства за патогенност на варианта
	PP4 – Клиничната картина на пациента е високо специфична за патогенен вариант в този ген
	PP5 – Много доказателства в литературата за патогенност на варианта, но лабораторията не може да го докаже самостоятелно

Откритите автоматично варианти, бяха верифицирани в различни бази данни: ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) и Ensembl (<https://www.ensembl.org/index.html>).

С оглед на насочеността към носителства на РС, от анализа са изключени гени с автозомно-доминантен (АД) и други нересесивни модели на унаследяване. В обхвата му попадат единствено гени с автозомно-рецесивно (АР), Х-рецесивно (ХР) и смесено (АР/АД) унаследяване. Единствено вариантите, оценени като клинично значими (патогенни и вероятно патогенни), бяха въведени в електронна база данни, съдържаща тяхната класификация и релевантни характеристики.

2.4 Генетично консултиране – В рамките на посттестовото консултиране на всички нерискови двойки беше разяснено значението на отрицателния резултат. Беше разяснено че липсата на носителство в едни и същи гени за АРС при двамата партньори или носителство в ген за ХРС не изключва напълно наличие на генетичен риск. Подчерта се, че използваният аналитичен подход има определени ограничения и че изследването не е информативно за някои от по-честите РС по-специално такива, обусловени от големи делеции/дупликации или варианти, локализирани извън изследваните кодиращи и гранични участъци.

При рисковите двойки с бяха обсъдени възможностите за последващо поведение и репродуктивни опции.

Освен по отношение на репродуктивния риск, участниците бяха консултирани и въз основа на установени находки с потенциално значение за личния им здравен риск, когато такива бяха идентифицирани. В тези случаи беше обсъдено клиничното значение на находките и, при необходимост, бяха дадени препоръки за допълнително уточняване, проследяване или насочване към съответен клиничен специалист.

2.5 Статистическа обработка на данните – Статистическият анализ на получените данните е извършван, с помощта на следните методи:

- Честотен анализ на промени, включващ абсолютни честоти в проценти.
- Определяне на статистическа значима връзка между две променливи е извършено с помощта на χ^2 тест за линейна тенденция (Cochran–Armitage).

При статистическата обработка на данните за честота е изчислен интервала на доверителност (95% CI). Определена е стойност на p (p -value) за статистическа значимост на данните, като за сигнификантни са отчитани стойности на $p < 0,05$.

Статистическата обработка е направена чрез използване на програмата SPSS for Windows, v.29.0.2.0

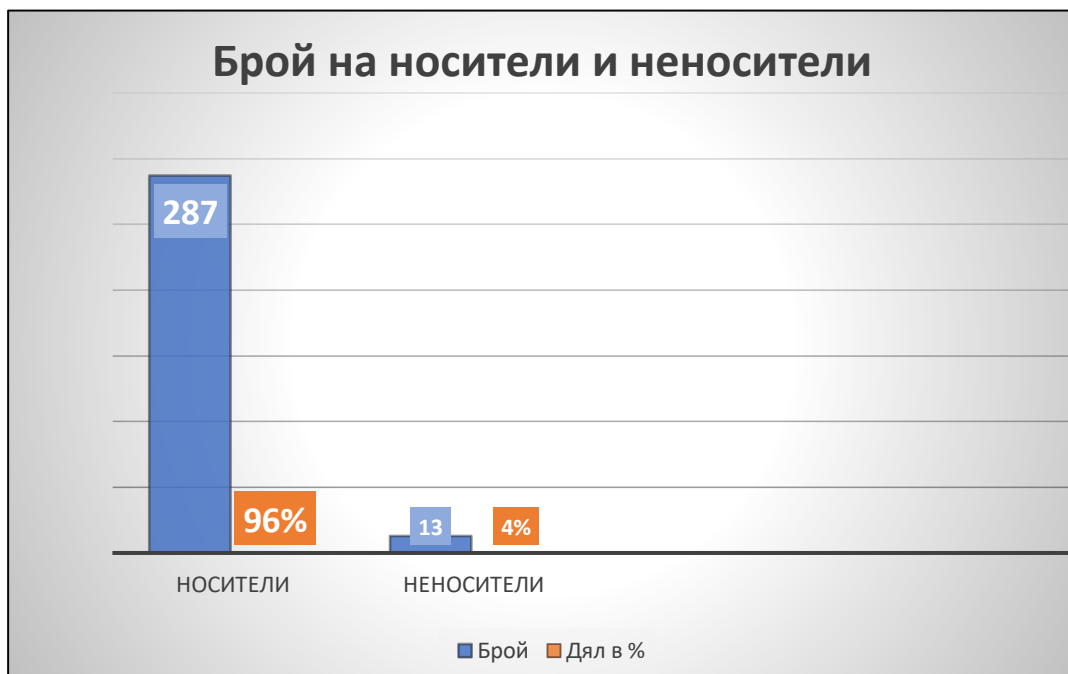
3. Методологични ограничения на използвания аналитичен подход

Настоящият дисертационен труд е ограничен от използвания аналитичен подход за РСН, основан единствено на NGS технология с клиничен екзом, включващ таргетен панел. Отсъствието на допълващи методи за анализ на копийния брой, като multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA), не позволява надеждната детекция на големи делеции и дупликации, което води до известна инсуфициентност на откриване на носителството при някои клинично и епидемиологично значими рецесивни и X-свързани МЗ, включително спинална мускулна атрофия и мускулна дистрофия тип Дюшен/Бекер. В допълнение, ограничението произтича и от факта, че използваният панел не обхваща регулаторните и дълбоките интронни области, което редуцира чувствителността на метода за откриване на патогенни варианти, характерни за бета-таласемия – заболяване с относително висока честота на носителство в българската популация. Ефектът от това е подценяване на действителната честота на носителството в изследваната кохорта.

IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Количествена оценка на носителския товар – честота и среден брой носителства на патогенни варианти за рецесивни моногенни заболявания в изследваната кохорта от българската популация

Установеният от нас дял на носители на патогенни/вероятно патогенни варианти (ПВ)* в гени асоцииращи с APC и XPC е 95,7% (n=287/300) (Фиг.1). Съответно дялът на индивидите, при които носителски товар за РС не беше открит, е 4,3% (n=13/300).

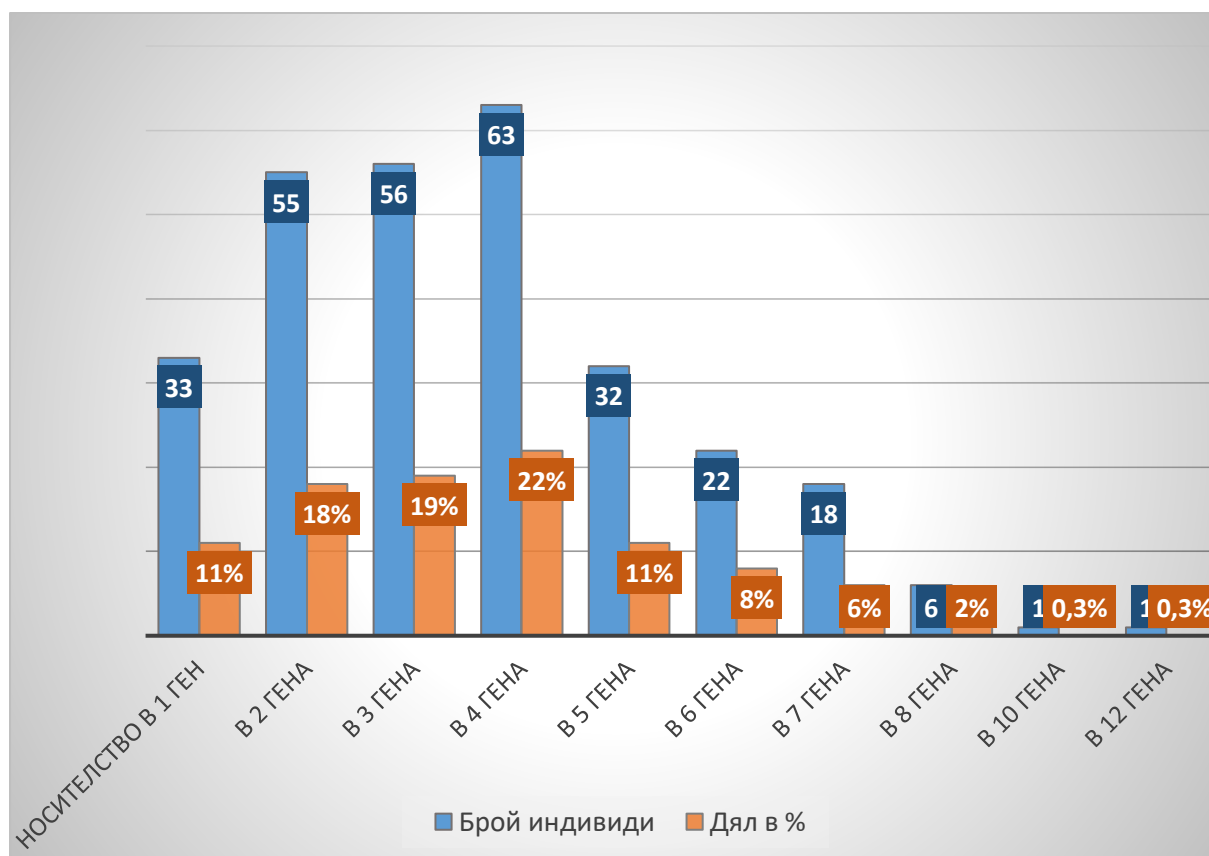


Фигура 1. Разпределение на изследваните индивиди според наличие или липса на носителство (в брой и в %)

Следователно, в рамките на изследваната кохорта, 96 индивида на 100 изследвани са с носителство на поне един ПВ в ген за РС, а 4 на 100 не носят нито един ПВ.

*В настоящото проучване термините „патогенен вариант“ и „вероятно патогенен вариант“ се използват обобщено под термина „патогенен вариант“. Макар да съществува формален нюанс в класификацията съгласно критериите на ACMG/AMP, клиничното значение на двата типа варианти в контекста на настоящия анализ е аналогично. Поради това, за целите на изложението, терминът „патогенен вариант“ се използва като равнозначен на понятието „мутация“.

Общият брой на установените носителства в проучването е 1051. Разпределението им по брой на индивид е представено на Фигура 2. и е както следва: носителство на ПВ в 1 ген беше установено при 11% от носителите (n=33/287); носителство в 2 гена – при 18% (n=55/287); в 3 гена – при 19% (n=56/287); в 4 гена – при 22% (n=63/287); в 5 гена – при 11% (n=32/287); в 6 гена – при 8% (n=22/287); в 7 гена – при 6% (n=18/287); в 8 гена – при 2% (n=6/287); в 10 гена – при 0,3% (n=1/287); в 12 гена – при 0,3% (n=1/287).



Фигура 2. Разпределение на носителствата според броя им в индивид

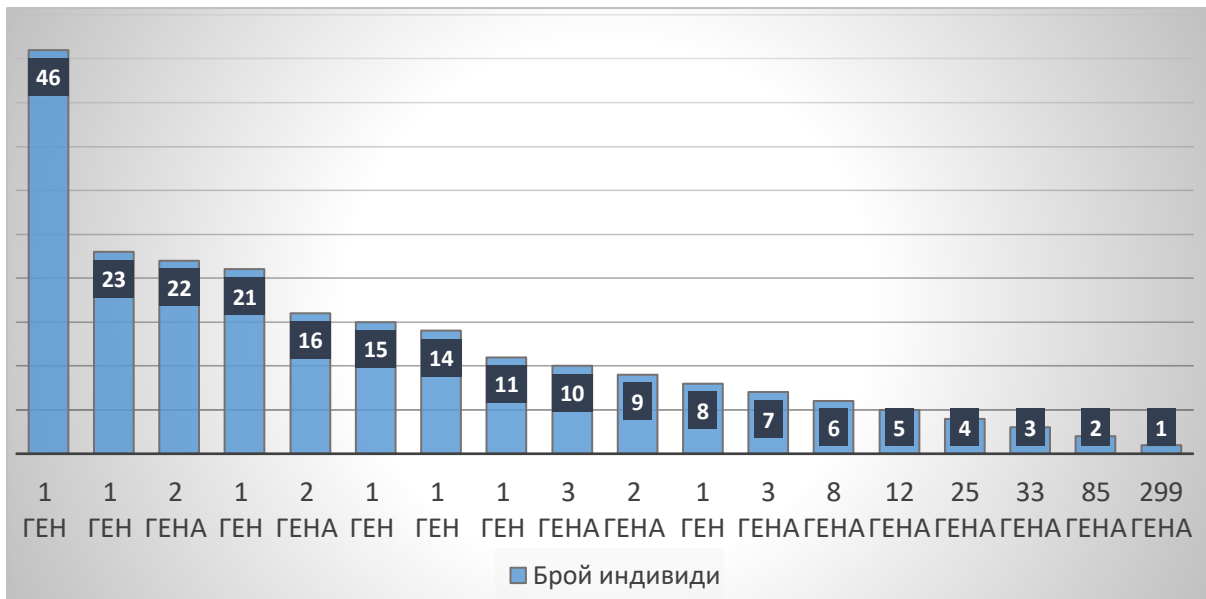
Предвид изложените данни, установихме, че средният брой носителства на ПВ за РС в индивид от изследваната кохорта е 3,5. В резултат на проведеното изследване беше установено, че средният брой носителства на патогенни и вероятно патогенни варианти за рецесивни заболявания на индивид от изследваната кохорта е 3,5. Следва да се подчертае, че директната числова съпоставка с публикувани данни за носителски товар е методологично ограничена поради съществени различия в използвания аналитичен подход, генния обхват и критериите за включване на варианти. За разлика от повечето публикувани проучвания, базирани на предварително селектирани таргетни панели, настоящото изследване използва екзом-базиран подход с широк генен обхват и без предварителна селекция.

От десетилетия в популационната генетика е утвърдена концепцията, че всеки клинично здрав индивид е носител на няколко рецесивни ПВ, които се проявяват фенотипно единствено в хомозиготно състояние. В този контекст концептуалното съпоставяне със съвременните екзом- и геном-базирани проучвания показва, че установеният в настоящото изследване носителски товар попада в очаквания диапазон за човешката популация. С това се потвърждава приложимостта на РСН за прецизно характеризирани на индивидуалния носителски профил.

2. Обща характеристика на гените с установено носителство и детайлен анализ на най-често засегнатите гени

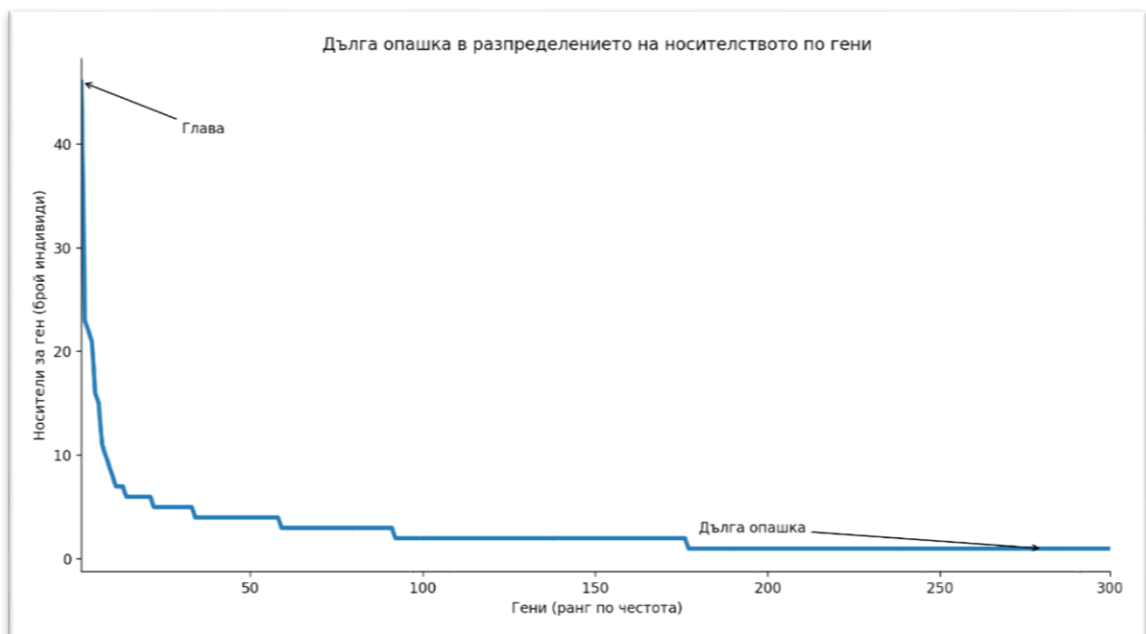
2.1 Обща характеристика на засегнатите гени

Анализът установи носителство на ПВ в 481 различни гена, класифицирани според типа на унаследяване като АР, смесени (АР/АД) и ХР. Разпределението на носителството по гени показва ясно изразен неравномерен модел (Фиг.3). За преобладаващата част от гените – 62% (n=299/481) – носителство беше установено в по един индивид. При 18% (n=85/481) от гените носителство се наблюдаваше при двама индивиди, при 7% (n=33/481) – в по трима, а при 6% (n=25/481) – в по четирима индивиди. По-висока честота на носителство (ЧН) се установи при значително по-малък брой гени, като при 2% (n=12/481) носителството е наблюдавано в по петима индивиди, при 2% (n=8/481) – в по шестима, а при 1% (n=3/481) – в по седем индивиди. В горния край на разпределението се открояват единични гени с изразено по-висока честота на носителство, включително един ген (*C2*), установен при осем индивида, два (*CYP24A1* и *FUT8*) – в по девет, три (*CLCN1*, *SERPINA1*, *G6PD*) – в по десет, един (*MPO*) – при единадесет, един (*BCHE*) – при 15 индивида. В допълнение, за два от гените (*CFTR* и *NPHS2*) носителството беше установено в по 16 индивида, за един (*GJB2*) – при 20, за два (*BTD* и *CYP21A2*) – в по 22, за един (*MEFV*) – при 23. Най-висока честота на носителство – 46 индивида от изследваната кохорта, отново беше установена за единствен ген (*ABCA4*).



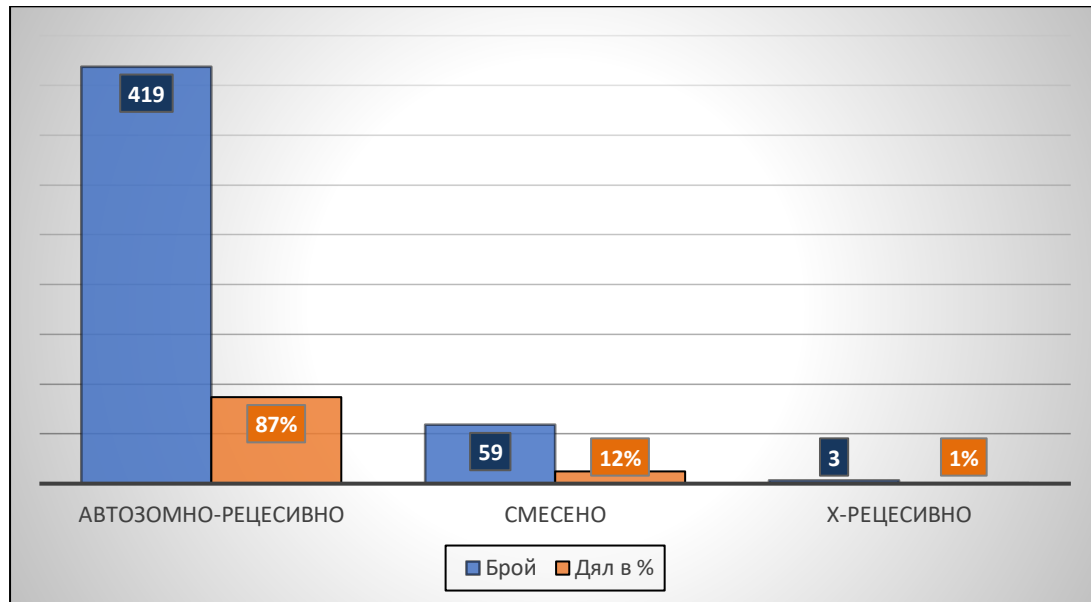
Фигура 3. Разпределение на броя гени с носителство според броя индивиди, при които са установени

Наблюдаваният модел на разпределение на носителството по гени е в съответствие с т.нар. „long-tail“ („дълга опашка“) модел на разпределение. Концепцията се свежда до наличие на ограничен брой по-чести заболявания и гени с относително по-висока ЧН, на фона на голям брой ултра редки състояния, представени с единични или изключително редки находки в популацията (Фиг.4).



Фигура 4. Моделът „дълга опашка“ в разпределението на носителствата по гени

В настоящото проучване, от всички 481 гена, 87% (n=419/481) асоциираха с АР тип на унаследяване, 12% (n=59/481) – със смесен тип на унаследяване (едновременно АР и АД) и 1% (n=3/481) – с ХР тип на унаследяване (Фиг.5).



Фигура 5. Разпределение на установените заболявания според типа на унаследяване

Придържайки се към стандарта на ACMG, прилагащ емпиричната система на Lazarin и съавт, поставихме всяко от заболяванията, за които открихме носителство, в една от следните категории – много тежко, тежко, умерено тежко и леко (profound, severe, moderate, mild). Класификацията се основава на клинични критерии, включващи възрастта на начало, влиянието върху преживяемостта, степента на физическо и/или интелектуално увреждане, необходимостта от медицинска интервенция и отражението върху качеството на живот.

При наличие на няколко фенотипа, асоцииращи с един и същ ген, за класифициране на тежестта на заболяването се взе под внимание най-тежкия клинично значим фенотип, наблюдаван при индивиди с бивалентни ПВ (хомозиготи и къмпануд хетерозиготи). В случаите на установено от нас носителство, асоцииращите заболявания се разпределят както следва: 19% (n=92/481) бяха причислени към категорията на много тежките, 40% (n=192/481) – към тежките, 35% (n=168/481) – към умерено тежките и 6% (n=29/481) – към леките (Фиг.6).



Фигура 6. Дялове на заболяванията от общата група според тяхната тежест

2.2 Дефиниране и анализ на най-често засегнатите гени

За най-често засегнати, ние определихме гените с носителство при ≥ 5 индивида ($\geq 5/300$), което съответства на минимална наблюдавана честота $\geq 1:60$ в изследваната кохорта. Клиничните състояния, асоцииращи с това носителство, можем да считаме за чести заболявания. Посочената честота е сравнима по порядък с носителските честоти на някои от най-широко разпространените APC, като спинална мускулна атрофия ($\sim 1:50$), вродена адренална хиперплазия, дължаща се на дефицит на 21-хидроксилаза ($\sim 1:60$), и бета-таласемия ($\sim 1:50$ в България). В настоящото проучване, от общо 481 засегнати гени, в които беше установено носителство, 7,9% ($n=38/481$) бяха в съответствие с посочената дефиниция (Табл.2). Този праг беше избран с цел повишаване стабилността на честотните оценки и ограничаване на влиянието на единични наблюдения при анализ на голям брой гени.

Таблица 2. Профил на най-често засегнатите гени

Ген	Фенотип / Състояние	Тип на унаследяване	Тежест	Общ брой индивиди	Честота на носителство (%)	95% CI (%)
<i>ABCA4</i>	Болест на Stargardt 1	АР	Умерено тежко	46	15,3	11,7–19,8
<i>MEFV</i>	Фамилна средиземноморска треска	Смесен	Умерено тежко	23	7,7	5,2–11,2
<i>BTD</i>	Биотинидазен дефицит	АР	Умерено тежко	22	7,3	4,9–10,9
<i>CYP21A2</i>	Вродена надбъбречна хиперплазия	АР	Тежко	22	7,3	4,9–10,9
<i>GJB2</i>	Автозомно-рецесивна глухота 1А	АР	Умерено тежко	21	7	4,6–10,5
<i>NPHS2</i>	Нефротичен синдром, тип 2	АР	Тежко	16	5,3	3,3–8,5
<i>CFTR</i>	Муковисцидоза	АР	Тежко	16	5,3	3,3–8,5
<i>BCHE</i>	Бутирилхолин естеразен дефицит	АР	Леко	15	5	3,1–8,1
<i>MPO</i>	Миелопероксидазен дефицит	АР	Леко	11	3,7	2,1–6,4
<i>CLCN1</i>	Вродена миотония	Смесен	Умерено тежко	10	3,3	1,8–6,0
<i>G6PD</i>	Глюкозо-6-фосфат дехидрогеназна недостатъчност	ХР	Умерено тежко	10	3,3	1,8–6,0
<i>SERPINA1</i>	Алфа-1-антитрипсинов дефицит	АР	Умерено тежко	10	3,3	1,8–6,0
<i>CYP24A1</i>	Инфантилна хиперкалциемия 1	АР	Умерено тежко	9	3	1,6–5,6
<i>FUT8</i>	Вродено нарушение на гликозилирането с	АР	Много тежко	9	3	1,6–5,6

	дефектна фукозилация 1					
<i>C2</i>	C2 дефицит	AP	Умерено тежко	8	2,7	1,4–5,2
<i>RBM8A</i>	Синдром на тромбоцитопения и липсващ радиус	AP	Тежко	7	2,3	1,1–4,7
<i>DNAH11</i>	Първична цилиарна дискинезия с или без situs inversus 7	AP	Умерено тежко	7	2,3	1,1–4,7
<i>WNT10A</i>	Ектодермална дисплазия 16	Смесен	Умерено тежко	7	2,3	1,1–4,7
<i>GBA1</i>	Болест на Гоше	AP	Тежко	6	2	0,9–4,3
<i>ABCC6</i>	Псевдоксантома еластикум	Смесен	Умерено тежко	6	2	0,9–4,3
<i>C8B</i>	C8 дефицит тип II	AP	Тежко	6	2	0,9–4,3
<i>DHCR7</i>	Синдром на Smith-Lemli-Opitz	AP	Много тежко	6	2	0,9–4,3
<i>ECM1</i>	Болест на Urbach-Wiethe	AP	Умерено тежко	6	2	0,9–4,3
<i>PAH</i>	Фенилкетонурия	AP	Тежко	6	2	0,9–4,3
<i>REL</i>	Имунодефицит 92	AP	Тежко	6	2	0,9–4,3
<i>USH2A</i>	Синдром на Usher, тип 2A	AP	Умерено тежко	6	2	0,9–4,3
<i>VWF</i>	Болест на von Willebrand	AP	Умерено тежко	6	2	0,9–4,3
<i>ACY1</i>	Аминоацилаза I дефицит	AP	Леко	6	2	0,9–4,3
<i>CD36</i>	Тромбоцитен гликопротеин IV дефицит	AP	Леко	5	1,7	0,7–3,8
<i>GNRHR</i>	Хипогонадотропен	AP	Леко	5	1,7	0,7–3,8

	хипогонадизъм 7 без аносмия					
<i>HFE</i>	Хемохроматоза	АР	Умерено тежко	5	1,7	0,7–3,8
<i>MMP20</i>	Амелогенеза имперфекта ПА2	АР	Леко	5	1,7	0,7–3,8
<i>PEX6</i>	Болест на пероксизомна биоогенеза 4А	Смесен	Много тежко	5	1,7	0,7–3,8
<i>POLG</i>	Синдром на изчерпване на митохондриалн ата ДНК 4В (тип MNGIE)	Смесен	Много тежко	5	1,7	0,7–3,8
<i>PROPI</i>	Комбиниран дефицит на хипофизни хормони, 2	АР	Умерено тежко	5	1,7	0,7–3,8
<i>RAD50</i>	Болест на Nijmegen breakage syndrome-like	Смесен	Тежко	5	1,7	0,7–3,8
<i>TRPM6</i>	Хипомагнезие мия 1, интестинална	АР	Умерено тежко	5	1,7	0,7–3,8
<i>UGT1A1</i>	Синдром на Gilbert	АР	Леко	5	1,7	0,7–3,8

От групата на честите заболяванията, 11% (n=4/38) бяха отнесени към категорията много тежки, 24% (n=9/38) – към категорията тежки, 47% (n=18/38) – към категорията умерено тежки и 18% (n=7/38) – към категорията леки (Фиг.7). Прави впечатление, че за разлика от общата група на заболяванията (асоцииращи с носителство), в която преобладаваха тежките (40%), в групата на честите заболявания преобладаваше дялът на умерено тежките (47%).



Фигура 7. Дялове на честите за изследваната кохорта заболявания според тяхната тежест

Извършен е сравнителен анализ на връзката между ЧН и клиничната тежест чрез χ^2 тест за линейна тенденция (Cochran–Armitage). Установена е статистически значима разлика в разпределението на тежестта между честите и редките гени, както и значима отрицателна асоциация между ЧН и тежестта на заболяванията.

Таблица 3. Дялове на честите и редките гени според групата на тежест асоцииращите с тях заболявания

Група заболявания	Чести гени	Редки гени
Леки + умерено тежки	65%	39%
Тежки + много тежки	35%	61%

Приблизително 2/3 от често засегнатите гени в изследваната кохорта асоциираха с умерено тежки и леки заболявания, докато приблизително 2/3 от редките гени са обвързани с много тежки и тежки клинични форми (Табл.3). Това наблюдение подкрепя наличието на отрицателна селекция срещу силно тежките генетични състояния на популационно ниво.

За заболяванията, за които бяха налични ясно дефинирани референтни популационни честоти на носителство, беше извършено формално статистическо сравнение с публикуваните данни чрез one-sample Z-test за пропорции. Този тест позволява да се оцени дали наблюдаваната ЧН в изследваната българска кохорта се различава статистически значимо от предварително зададена референтна честота, като

отчита размера на извадката и очакваната статистическа вариабилност. Резултатите от статистическите сравнения са обобщени в Таблица 4.

Таблица 4. Сравнение на честотата на носителство в 12 от най-често засегнатите в изследваната кохорта гени с референтна честота

Ген/Фенотип	БГ носители (x/300)	БГ честота %	Реф. честота %	Z	p-value	Извод
<i>ABCA4</i> / Болест на Stargardt 1	46/300	15,3	5,0	+8,21	<0,0001	БГ > реф.
<i>BTBD</i> /Биотинидазен дефицит	22/300	7,3	0,83	+12,38	<0,0001	БГ > реф.
<i>CYP21A2</i> /Вродена надбъбречна хиперплазия	22/300	7,3	1,82	+7,15	<0,0001	БГ > реф.
<i>NPHS2</i> /Нефротичен синдром, тип 2	16/300	5,3	7,69	-1,53	0,13	n.s. (съпоставимо)
<i>CFTR</i> /Муковисцидоза	16/300	5,3	4,0	+1,18	0,24	n.s. (съпоставимо)
<i>CLCN1</i> /Вродена миотония	10/300	3,3	0,89	+4,49	<0,0001	БГ > реф.
<i>SERPINA1</i> /A1AT дефицит	10/300	3,3	10,0	-3,85	0,0001	БГ < реф.
<i>CYP24A1</i> /Инфантилна хиперкалциемия 1	9/300	3,0	1,0	+3,48	0,0005	БГ > реф.
<i>DHCR7</i> /Smith–Lemli–Opitz	6/300	2,0	1,85	+0,19	0,85	n.s. (съпоставимо)
<i>PAH</i> /Фенилкетонурия	6/300	2,0	2,0	0,00	1,00	n.s. (съвпадение)
<i>USH2A</i> /Usher тип 2A	6/300	2,0	1,43	+0,83	0,40	n.s. (съпоставимо)
<i>GBA1</i> /Болест на Гоше	5/300	1,7	0,5	+2,87	0,004	БГ > реф.

От заболяванията, за които беше възможно формално статистическо сравнение, приблизително 42% (n=5/12) показаха съвпадение между наблюдаваната ЧН в българската кохорта и референтните стойности, докато при 67% (n=8/12) се установи статистически значимо разминаване. В повечето случаи на разминаване ЧН беше по-висока в извадката от българската популация, което предполага възможно популационно-специфично натрупване на ПВ. Касае се за носителство в следните гени – *ABCA4*, *BTBD*, *CYP21A2*, *CLCN1*, *CYP24A1*, *GBA1*. Само при един ген – *SERPINA1*, беше наблюдавана статистически значимо по-ниска честота спрямо публикуваните данни.

Тези резултати подчертават както общата съпоставимост с европейските данни при част от заболяванията, така и наличието на специфични отклонения с потенциално клинично значение.

3. Молекулно профилиране на патогенните варианти в най-често засегнатите гени

В настоящото проучване, сред всички изследвани лица ($n=300$), бяха идентифицирани 690 различни варианта в категорията патогенни/вероятно патогенни според класификацията на ACMG/AMP. От тях, 68% ($n=470/690$) са известни и фигурират в медицинската литература. Останалата приблизително 1/3 или 32% ($n=220/690$) представляват нови, недокладвани в популационни и клинични и бази данни към момента на анализ (Фиг.8).



Фигура 8. Дялове на известни и нови ПВ, открити в настоящото проучване

NGS технологиите се отличават със значително висока детекционна способност, което обуславя идентифицирането на широк спектър от генетични вариации. Към последните се отнасят освен редки и нови недокладвани варианти, както е показано в мащабни екзомни и геномни проучвания. В този контекст наблюдаваният в настоящото проучване дял от 32% на нови ПВ може да се интерпретира като логично следствие от използвания аналитичен подход, включващ клинично екзомно секвениране без предварителна селекция на гени, както и от ограничената представеност на българската популация в съществуващите клинични и популационни референтни бази данни.

Както бе посочено, като най-често засегнати гени бяха дефинирани тези, за които носителство бе установено при ≥ 5 индивида ($\geq 5/300$), което съответства на минимална наблюдавана честота от $\geq 1:60$ в изследваната кохорта. За всички тях бе извършен детайлен анализ на молекулната характеристика на откритите ПВ. Този анализ е проведен в съответствие с критериите за патогенност на ACMG/AMP, представени в Таблица 1 в раздел „Материал и методи“.

В 38-те гена, които бяха в съответствие с посочената дефиниция, се установиха общо 119 ПВ, които бяха класифицирани според тяхното клинично значение, определено въз основа на литературни данни. Най-голям беше дялът на вариантите, асоцииращи с тежък ефект – 48% ПВ ($n=57/119$). Такива бяха идентифицирани при 172 от изследваните индивиди. Около 34% от ПВ ($n=41/119$) бяха свързани с лек ефект или асоциации с по-лек фенотип, като бяха установени при 176 индивида. Значително по-малък е дялът на вариантите с междинен ефект – 8% ПВ ($n=9/119$), открити при 13 индивида. Следва да се отбележи, че определянето на междинен ефект е извършено чрез задълбочена експертна интерпретация и оценка на наличните клинични и литературни данни, като обект на подобна класификация са ограничен брой гени. За 10% от ПВ ($n=12/119$) тежестта на фенотипния ефект не може да бъде еднозначно определена, като такива бяха установени при 20 индивида. Изложените данни показват, че в изследваната група преобладаваха вариантите с тежък клиничен ефект, следвани от тези, асоцииращи с по-лек фенотип (Фиг.9). Въпреки това, разпространението на тежките и леките варианти в честите гени беше приблизително еднакво.



Фигура 9. Дялове на ПВ, открити в групата на често засегнатите гени

От 119-те ПВ, открити в 38-те най-често засегнати гени, 6% (n=7/119) бяха нови, недокладвани към момента на анализ (Табл.5).

Таблица 5. Нови ПВ, открити в групата на често засегнатите гени

Ген/Фенотип	Вариант	Транскрипт	Тип на варианта
<i>GJB2</i> /Автозомно-рецесивна глухота 1А	c.252del (p.Ser85ProfsTer6)	NM_004004.6	Frameshift
<i>FUT8</i> /Вродено нарушение на гликозилирането с дефектна фукозилизация 1	c.286C>T (p.Gln96Ter)	NM_004480.4	Stop gained
<i>ECM1</i> /Болест на Urbach-Wiethe	c.135_136insG (p.Pro46AlafsTer16)	NM_004425.5	Frameshift
<i>ECM1</i> /Болест на Urbach-Wiethe	c.386-1G>A	NM_004425.5	Splice acceptor
<i>CD36</i> /Тромбоцитен гликопротеин IV дефицит	c.535_536del (p.Leu179MetfsTer4)	NM_001001548.3	Frameshift
<i>CD36</i> /Тромбоцитен гликопротеин IV дефицит	c.962dup (p.Asn321LysfsTer32)	NM_001001548.3	Frameshift
<i>TRPM6</i> /Хипомагниезимия 1, интестинална	c.955del (p.Thr319GlnfsTer25)	NM_017662.6	Frameshift

Посочените варианти бяха класифицирани като вероятно патогенни съгласно критериите на ACMG/AMP, въз основа на аналогични причини, а именно рядкостта им в популацията, предвид отсъствието им в популационни бази данни като gnomAD (PM2),

както и съвпадение на молекулната им характеристика (загуба на функция, LOF) с установения патогенен механизъм на съответното заболяване (PVS1).

4. Оценка на двойки с потенциален репродуктивен риск и идентифициране на реално рискови двойки

4.1 Дефиниция на рискова двойка в настоящото проучване

Рискова двойка (РД) се дефинира като репродуктивна двойка с повишен репродуктивен риск (РР) за генетично заболяване при потомството, включващ APC при носителство при двамата партньори на ПВ в един и същ ген и X-свързани състояния при носителство на ПВ при жената партньор. В стандартните скринингови модели съдържанието на панелите обикновено е ограничено до генетични заболявания с тежка клинична изява. За разлика от тези подходи, в настоящото проучване РР и съответно РД се дефинират по-обширно, като клинично-екзомният анализ включва и състояния с лек и умерено тежък фенотип, които подлежат на последваща молекулна и клинична интерпретация с оглед тяхната клинична значимост и величината на оцененния РР.

В качеството си на потенциално рискови бяха разгледани 11,3% (n=17/150) от изследваните двойки. В тази група бяха включени двойки със съвпадение на носителство на ПВ в един и същ ген, асоцииращ APC, както и двойки, при които при жената партньор бе установено носителство на ПВ в ген, асоцииращ с ХРС.

4.2 Репродуктивна двойка № 1

Таблица 6. Репродуктивно рискови генетични варианти при двойка № 1

Ген/Фенотип	Партньор	Вариант	Тип	Класификация
CYP21A2/ Вродена надбъбречна хиперплазия	Жена	c.1174G>A (p.Ala392Thr)	Missense	Вероятно патогенен
	Мъж	c.1174G>A (p.Ala392Thr)	Missense	Вероятно патогенен

Вариантът, установен при всеки от двамата партньори в репродуктивна двойка № 1, се класифицира като вероятно патогенен според критериите на ACMG/AMP. CYP21A2 е ген, при който миссенс измененията са утвърден механизъм на заболяване и честотата на доброкачествените миссенс варианти е ниска (PP2). Посоченият вариант е рядък в общата популация и под праговете за APC (PM2). Налични са функционални данни, показващи намалена активност на 21-хидроксилазата, които подкрепят увреждащ ефект

на варианта (PS3). В публикации и бази данни p.Ala392Thr е описан при засегнати индивиди в транс с друг ПВ, съответстващо на рецесивния модел на унаследяване (PM3). Следва да се подчертае, че *CYP21A2* гена и ПВ открити в него са сложни за анализ, поради наличието на силно хомоложен псевдоген *CYP21A1P*. Предвид това интерпретацията остава условна и изисква ясно документиране, че функционалните данни се отнасят до вариант, еднозначно локализиран в активния *CYP21A2* ген (т.е. изключена е псевдогенна коамплификация или генна конверсия). С оглед прецизиране на риска при конкретната двойка, е необходимо да се провери дали установеният при всеки от партньорите вариант произхожда от активния *CYP21A2* ген или от псевдогена.

В обобщение, рискът за потомството от изследваната двойка да бъде засегнато от AP заболяване свързано с *CYP21A2*, може да бъде оценен като повишен (25%) само при условие, че и при двамата партньори вариантът c.1174G>A (p.Ala392Thr) е доказано локализиран в активния *CYP21A2* ген, а не произхожда от псевдогена *CYP21A1P*.

4.3 Репродуктивна двойка № 2

Таблица 7. Репродуктивно рискови генетични варианти при двойка № 2

Ген/Фенотип	Партньор	Вариант	Тип	Класификация
<i>NEB</i> / Немалинова миопатия	Жена	c.24094C>T (p.Arg8032Ter)	Stop gained	Патогенен
	Мъж	c.25441C>T (p.Arg8481Ter)	Stop gained	Патогенен

Вариантът c.24094C>T (p.Arg8032Ter), открит при жената партньор от посочената двойка се класифицира като патогенен според ACMG/AMP. Представлява нонсенс, водещ до преждевременен стоп кодон и очаквана LOF на протеина, което е утвърден патогенен механизъм при *NEB* гена (PVS1). Вариантът е рядък или липсва в общата популация, в съответствие с AP модел на унаследяване (PM2). В допълнение, типът на варианта е в съгласие с добре описания спектър от патогенни скъсяващи изменения при *NEB* (PP2).

Вариантът c.25441C>T (p.Arg8481Ter), открит при мъжа партньор, е аналогичен на предходния като тип на варианта (нонсенс), очакван молекулярен ефект (LOF чрез преждевременен стоп-кодон) и покриване на същите ACMG/AMP критерии за патогенност, поради което се класифицира като патогенен.

Предвид изложените резултати, съществува 25%-ов риск при всяка бременност на двойката, двата ПВ да бъдат предадени съвместно на потомството, във вид на къмпаунд хетерозиготен генотип. Комбинацията от два нонсенс алела в *NEB* гена представлява двуалелна LOF, което е утвърден молекулярен механизъм при NEB-свързаната немалинова миопатия. Предвид молекулната характеристика на вариантите, се очаква развитие на фенотип с умерена до тежка изява. Умерените и тежките форми се характеризират с раннодетска мускулна слабост, хипотония, забавено моторно развитие и често дихателно засягане, при обичайно запазен интелект.

4.4 Репродуктивна двойка № 3

Таблица 8. Репродуктивно рискови генетични варианти при двойка № 3

Ген/Фенотип	Партньор	Вариант	Тип	Класификация
<i>ABCA4</i> / Болест на Stargardt 1	Жена	c.514G>A p.(Gly172Ser)	Missense	Вероятно патогенен
	Мъж	c.5603A>T p.(Asn1868Ile)	Missense	Патогенен

Вариантът c.514G>A (p.Gly172Ser) в *ABCA4* гена на жената от репродуктивна двойка № 3 се класифицира като вероятно патогенен поради засягане на еволюционно консервативна аминокиселина във функционално значим регион на белтъчния продукт и неблагоприятни *in silico* предикции (PP3), ниска популационна честота в големи референтни бази данни (PM2), както и описване при засегнати индивиди в комбинация с други ПВ (PP4).

Вариантът c.5603A>T (p.Asn1868Ile) открит при мъжа от посочената двойка, не е класически ПВ, а се класифицира като патогенен хипоморфен* с непълна пенетрантност** (<5%) и вариабилна клинична изява, проявяваща се предимно в комбинация с тежки ПВ в *ABCA4*. Асоциира с по-късно начало и по-лека форма на *ABCA4*-асоциирана ретинопатия.

Пенетрантността на варианта p.Asn1868Ile, когато се намира в транс с тежък ПВ, се оценява на около 5% или по-ниска на популационно ниво. В същото време, в отделни проучвания, базирани на семейства с вече засегнати индивиди, са докладвани значително по-високи стойности на пенетрантност, достигащи приблизително до 65%. В разглеждания казус липсват данни за фамиленост или клинична изява на *ABCA4*-асоциирано заболяване. Поради това, при оценката на риска за потомството следва да се

използват популационните данни за пенетрантност. При наличие на 25%-ов риск за унаследяване на двата варианта в къмпаунд хетерозиготно състояние и при допускане за пенетрантност <5% за p.Asn1868Ile в комбинация с вероятно патогенен вариант в *ABCA4*, реалният риск за развитие на клиничен фенотип при потомството се оценява приблизително на около 1%.

Предвид ниската оценена величина на реалния фенотипен риск за потомството, разглежданата репродуктивна двойка бе изключена от групата на рисковите.

*Хипоморфен вариант – генетичен вариант, водещ до частично намаляване на функцията на гена или кодирания протеин. При някои хипоморфни варианти клинична изява се наблюдава основно при комбиниране (в транс) с класически патогенен алел.

**Непълна пенетрантност – състояние, при което не всички носители на даден вариант проявяват съответния клиничен фенотип. В контекста на APC непълната пенетрантност означава, че не всички индивиди с бивалентни варианти в даден ген развиват клиничен фенотип, като изявата зависи от остатъчната функция на вариантите и генетичния контекст.

4.5 Репродуктивна двойка № 4

Таблица 9. Репродуктивно рискови генетични варианти при двойка № 4

Ген/Фенотип	Партньор	Вариант	Тип	Класификация
<i>MEFV</i> Фамилна средиземноморска треска	Жена	c.2230G>T (p.Ala744Ser)	Missense	Вероятно патогенен
	Мъж	c.2084A>G (p.Lys695Arg)	Missense	Контекст- зависима патогенност

c.2230G>T (p.Ala744Ser) в *MEFV* гена на жената се класифицира като вероятно патогенен според ACMG/AMP критериите. Многократно е докладван при пациенти с фамилна средиземноморска треска, включително в хомозиготно и къмпаунд хетерозиготно състояние (PS4). Засяга функционално значим домен на пирина, в който са концентрирани патогенни миссенс изменения (PM1). Има ниска популационна честота, несъвместима с доброкачествен полиморфизъм (PM2). In silico анализи подкрепят неблагоприятен функционален ефект (PP3). Докладван при пациенти с фенотип, асоцииращ с *MEFV* (PP4), като клиничната му изява е с вариабилна експресивност и непълна пенетрантност.

c.2084A>G (p.Lys695Arg) е миссенс вариант с конфликтна интерпретация в клиничните бази данни. Най-често се класифицира като VUS или вероятно патогенен с непълна пенетрантност. Описван е както при пациенти с лека или атипична форма на фамилна средиземноморска треска, така и при клинично здрави носители, включително в хетерозиготно и къмпаунд хетерозиготно състояние. Вариантът е свързан с вариабилна експресивност, ниска предсказуема клинична значимост и липса на асоциация с тежък фенотип, поради което самостоятелно рядко води до клинично значимо заболяване и обикновено се интерпретира предпазливо в контекста на другия алел и клиничната картина.

Съществува 25%-ов риск за къмпаунд хетерозиготен генотип в потомството на посочената двойка, съставен от двата варианта. Предвид характера на установените варианти, се очаква лека до умерена клинична изява с добра терапевтична повлияемост.

4.6 Репродуктивна двойка № 5

Таблица 10. Репродуктивно рискови генетични варианти при двойка № 5

Ген/Фенотип	Партньор	Вариант	Тип	Класификация
<i>BTBD</i> / Биотинидазен дефицит	Жена	c.1336G>C (p.Asp446His)	Missense	Патогенен
	Мъж	c.1336G>C (p.Asp446His)	Missense	Патогенен

И в двамата партньори от посочената двойка открихме варианта c.1336G>C (p.Asp446His) в *BTBD* гена. Класифицира се като патогенен, тъй като е многократно описан при пациенти с биотинидазна недостатъчност, включително в хомозиготно и къмпаунд хетерозиготно състояние (PS4), асоциира с понижена биотинидазна активност, доказана чрез функционални/ензимни изследвания (PS3), засяга функционално критичен регион на белтъчния продукт (PM1) и съответства на установения механизъм на заболяването – загуба на ензимна функция (PP4).

Отново разглеждаме 25%-ов риск за хомозиготен генотип в потомството. Въпреки това, наличните клинични и функционални данни показват, че p.Asp446His е хипоморфен вариант, асоцииращ с частичен биотинидазен дефицит, който в хомозиготно състояние протича предимно асимптоматично или с минимална клинична изява. Очакваният фенотип не води до клинично значимо засягане на здравето и е напълно предотвратим и лечим при своевременно приложение на биотин.

Предвид това, въпреки наличието на теоретичен генетичен риск, двойка № 5 не беше класифицирана като рискова.

4.7 Репродуктивна двойка № 6

Таблица 11. Репродуктивно рискови генетични варианти при двойка № 6

Ген/Фенотип	Партньор	Вариант	Тип	Класификация
<i>SERPINA1</i> / Алфа-1- антитрипсинов дефицит	Жена	c.1177C>T (p.Pro393Ser)	Missense	Патогенен
	Мъж	c.1096G>A (p.Glu366Lys)	Missense	Патогенен

Вариантът c.1177C>T (p.Pro393Ser, M Würzburg) в *SERPINA1* гена на жената партньор се класифицира като патогенен. Налични функционални данни показват

нарушена стабилност и секреция на α 1-антитрипсина, водещи до понижени серумни нива, съответстващи на частичен α 1-антитрипсинов дефицит (PS3). Вариантът е многократно описан при индивиди с биохимично потвърден α 1-антитрипсинов дефицит и е обогатен при засегнати спрямо общата популация (PS4). Докладван е с ниска честота в общата популация (PM2). Свързан е със специфичен за *SERPINA1* фенотип, характеризиращ се с понижени серумни нива на α 1-антитрипсин с обикновено лека до умерена клинична значимост (PP4). Налични са и ограничени фамилни данни, подкрепящи сегрегация със заболяването (PP1).

Вариантът с.1096G>A (p.Glu366Lys, Pi*Z) при мъжа партньор се класифицира като патогенен. Асоциира с изразено понижени серумни нива на α 1-антитрипсин, вследствие на нарушено нагъване и втреклетъчно задържане на протеина (PS3). Многократно е докладван при индивиди с клинично и биохимично потвърден α 1-антитрипсинов дефицит (PS4). Свързан е със специфичен за *SERPINA1* фенотип – умерено понижени серумни нива на α 1-антитрипсин с вариабилен, обикновено нисък до умерен риск за белодробно засягане и нисък риск за чернодробно засягане (PP4).

Отново се разглежда 25%-ов риск за предаване на двата варианта във вид на къмпаунд хетерозиготен генотип в потомството. При такъв генотип се очакват междинни до ниски серумни нива на α 1-антитрипсин, обикновено по-ниски от тези при PiMZ и в диапазон, сходен с PiSZ, което е свързано с умерено до повишен риск за развитие на белодробно засягане (ХОББ/емфизем). Този риск е значително повлиян от средови фактори, като тютюнопушене и други инхалационни експозиции. Рискът за чернодробно засягане при такъв генотип се оценява като нисък до умерен, значително по-нисък в сравнение с класическия Pi*ZZ генотип, но не може да бъде изключен, поради доказани секреторен дефект на засегнатите алели и възможен кумулативен клетъчен стрес в хепатоцитите. Налице е непълна пенетрантност и вариабилна клинична изява, поради което реалният клиничен фенотип не може да бъде предсказан само въз основа на генотипа. Клиничната оценка и проследяването следва да се базират както на серумното ниво на α 1-антитрипсин, така и на клиничния статус и експозиционните фактори.

4.8 Репродуктивни двойки № 7 и 8

Таблица 12. Репродуктивно рискови генетични варианти при двойки № 7 и 8

Ген/Фенотип	Партньор	Вариант	Тип	Класификация
<i>NPHS2</i> / Нефротичен синдром, тип 2	Жена	c.686G>A (p.Arg229Gln)	Missense	Вероятно патогенен
	Мъж	c.686G>A (p.Arg229Gln)	Missense	Вероятно патогенен

В две от изследваните двойки се разглежда аналогичен казус – всеки от партньорите е носител на ПВ c.686G>A (p.Arg229Gln) в *NPHS2* гена. Посоченият вариант е хипоморфен с ясно дефинирана контекст-зависима патогенност, която се проявява при къмпануд хетерозиготност в комбинация с тежък ПВ в *NPHS2*. Наличните функционални данни показват частично нарушена функция на подоцин с намалено взаимодействие с нефрин, без пълна загуба на протеинова активност (PS3). Клинична асоциация със заболяване се наблюдава предимно при къмпануд хетерозиготност (в транс) с патогенен *NPHS2* вариант, при което са приложими PM3, както и подкрепящи данни за сегрегация и обогатяване при засегнати индивиди (PP1, PS4).

Съществуващите клинични и популационни данни убедително показват, че хомозиготното носителство на p.Arg229Gln не причинява болестен фенотип. Следователно, репродуктивна двойка, при която и двамата партньори са хетерозиготни носители на този вариант, не се разглежда като двойка с повишен риск за засегнато потомство. На това основание, репродуктивни двойки № 7,8 се изключват от групата на рисковите.

4.9 Репродуктивна двойка № 9

Таблица 13. Репродуктивно рискови генетични варианти при двойка № 9

Ген/Фенотип	Партньор	Вариант	Тип	Класификация
<i>MARS1</i> / Интерстициална белодробна и чернодробна болест	Жена	c.2114dup (p.Leu705PhefsTer19)	Frameshift	Вероятно патогенен
	Мъж	c.2114dup (p.Leu705PhefsTer19)	Frameshift	Вероятно патогенен

Към момента на анализ установеният от нас вариант c.2114dup (p.Leu705PhefsTer19) е нов и не фигурира в нито една база данни. Представява

дубликация, водеща до изместване в рамката на четене и създаване на преждевременен стоп кодон. Очакваният ефект е липсващ или скъсен белтъчен продукт, тоест LOF (PVS1). Последният е установен механизъм на заболяване за *MARS* (AP *MARS*-свързани енцефалопатии и интерстициални белодробни заболявания). Вариантът не е описан в популационни бази данни (PM2). Предвид изложените данни, се класифицира като вероятно патогенен според ACMG/AMP. При хомозиготно състояние в потомството на посочената двойка (рискът за което е 25%) p.Leu705PhefsTer19 се очаква да доведе до LOF на *MARS* гена. Предвид установения механизъм от типа LOF за *MARS* гена, силно вероятна е клинична изява, но поради липса на публикувани данни за конкретния вариант и известната фенотипна вариабилност, тежестта и спектърът на заболяването не могат да бъдат предвидени.

4.10 Репродуктивни двойки № 10,11,12,13,14 и 15

Таблица 14. Репродуктивно рисков генетичен вариант при двойки № 10,11,12,13,14 и 15

Ген/Фенотип	Партньор	Вариант	Тип	Класификация
<i>G6PD</i> / Глюкозо-6-фосфат дехидрогеназна недостатъчност	Жена	c.653C>T (p.Ser218Phe)	Missense	Патогенен

В 6 от РД беше разглеждан идентичен казус – хетерозиготно носителство на c.653C>T (p.Ser218Phe) в *G6PD* гена при жената партньор. Предвид начина на унаследяване на глюкозо-6-фосфат дехидрогеназен дефицит (X-рецесивен), във всяка от тези двойки съществува 50%-ов риск за всеки от синовете. p.Ser218Phe се класифицира като патогенен, тъй като е многократно асоцииран с клинично изявен G6PD дефицит (PS4), води до значително намалена ензимна активност, доказана чрез функционални и биохимични изследвания (PS3), и показва ясна генотип-фенотип корелация с фенотип на остра хемолитична анемия при оксидативен стрес, обикновено съответстващ на WHO клас II (понякога II–III), което е специфично за G6PD-свързано заболяване (PP4). В медицинската литература е известен като „средиземноморски“ и асоциира с тежък дефицит на глюкозо-6-фосфат дехидрогеназния ензим (WHO клас II). Клинично той се изразява в по-лесното и по-изразено протичане на хемолизата вследствие експозиция на оксидативен стрес (включително инфекции, определени медикаменти и консумация на фава). Проявява се с остра хемолитична анемия, хемоглобинурия и необходимост от

болнично лечение, като рискът за тежки епизоди е по-висок в сравнение с по-леките варианти в *G6PD*.

4.11 Репродуктивна двойка № 16

Таблица 15. Репродуктивно рисков генетичен вариант при двойка № 16

Ген/Фенотип	Партньор	Вариант	Тип	Класификация
<i>G6PD</i> / Глюкозо-6- фосфат дехидрогеназна недостатъчност	Жена	c.934G>C (p.Asp312His)	Missense	Патогенен

В посочената двойка отново се касае за 50%-ов риск при всеки от синовете, поради носителство на ПВ в *G6PD* гена при жената партньор. Установеният вариант c.934G>C (p.Asp312His) се класифицира като патогенен. Той е многократно докладван при пациенти с клинично значим *G6PD* дефицит с типичен фенотип (PS4), води до доказано намалена ензимна активност (PS3) и асоциира със специфичен фенотип – остра хемоллиза при оксидативен стрес, съответстващ на WHO клас III (PP4). Разликата между този и предходните разгледани случаи с *G6PD* дефицит се свежда до степента на клинична тежест. p.Asp312His асоциира с лек фенотип, проявява се с хемоллиза единствено при значим оксидативен стрес и се обвързва с минимален риск за тежки или хронични усложнения.

4.12 Репродуктивна двойка № 17

Таблица 16. Репродуктивно рисков генетичен вариант при двойка № 17

Ген/Фенотип	Партньор	Вариант	Тип	Класификация
<i>DMD</i> / Дюшен/Бекер мускулна дистрофия	Жена	c.960+2T>C	Splice donor	Вероятно патогенен

При двойка № 17 установихме нов, недокладван към момента на анализа вариант в *DMD* гена при жената партньор. c.960+2T>C засяга каноничен донорен сплайсинг участък (+2 позиция) на интрон в *DMD* гена, което с голяма вероятност води до нарушен сплайсинг (екзон-скипинг, интронна ретенция или използване на криптичен сайт).

Рамката на четене се измества като вторичен ефект и се създава преждевременен стоп кодон. Очаква се LOF на белтъчния продукт – дистрофина, вследствие на нонсенс-медирана деградация на mRNA или по-малко вероятно – синтез на нефункционален скъсен продукт. LOF е установен и доминиращ болестен механизъм за *DMD* гена, водещ до Дюшен/Бекер мускулна дистрофия (PVS1). Вариантът е нов и отсъства от популационни бази данни (PM2). Предвид изложените данни, с.960+2T>C се класифицира като вероятно патогенен.

Посоченото състояние е с XR унаследяване, което определя 50%-ов риск за всеки от синовете на двойката. Отчитайки силно вероятното изместване в рамката на четене и загубата на функция на дистрофина, с.960+2T>C се очаква да асоциира с мускулна дистрофия тип Дюшен. Въпреки това, поради възможни алтернативни сплайсинг механизми, Бекер фенотип не може да бъде напълно изключен.

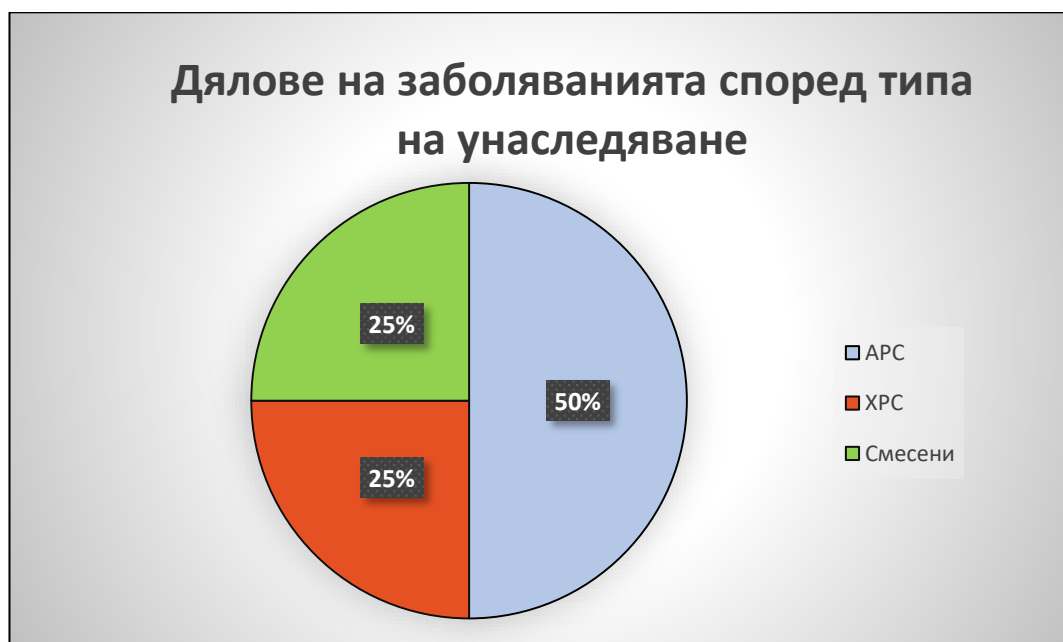
4.13 Характеристика на групата на реално рисковите репродуктивни двойки



Фигура 9. Разпределение на двойките според наличие или липса на репродуктивен риск (в брой и в %)

След проведения анализ на посочените 17 репродуктивни двойки установихме, че за 4 от тях не е оправдано класифицирането им като рискови. Делът на реалните РД, според критериите на настоящото проучване е 9% (n=13/150) (Фиг.9)

При РД бяха идентифицирани общо 8 гена за РС, свързани с повишен риск за потомството. От тях 4 са APC , 2 са ХРС и 2 със смесен тип на унаследяване (АР и АД) (Фиг.10).



Фигура 10. Дялове на заболяванията, установени в групата на РД, според типа на унаследяване

В приблизително 2/3 или 62% от РД (n=8/13) се установява повишен риск за ХРС (Табл.17).

Таблица 17. Заболявания при РД с ХР тип на унаследяване

Ген	Заболяване	Степен на тежест	Брой РД
<i>G6PD</i>	Глюкозо-6-фосфат дехидрогеназна недостатъчност	Средно тежко	7
<i>DMD</i>	Дюшен/Бекер мускулна дистрофия	Тежко	1

В 31% от РД (n=4/13), състоянието за което се коментира повишен риск, е АР (Табл.18).

Таблица 18. Заболявания при РД с АР тип на унаследяване

Ген	Заболяване	Степен на тежест	Брой РД
<i>CYP21A2</i>	Вродена надбъбречна хиперплазия	Тежко	1
<i>NEB</i>	Немалинова миопатия	Тежко	1
<i>ABCA4</i>	Болест на Stargardt 1	Средно тежко	1
<i>SERPINA1</i>	Алфа-1-антитрипсинов дефицит	Средно тежко	1

В 15 % от РД (n=2/13) разглеждаме повишен риск за заболяване със смесен тип на унаследяване (Табл.19).

Таблица 19. Заболявания при РД със смесен тип на унаследяване

Ген	Заболяване	Степен на тежест	Брой РД
<i>MEFV</i>	Фамилна средиземноморска треска	Средно тежко	1
<i>MARS</i>	Интерстициална белодробна и чернодробна болест	Тежко	1

Предвид изложените данни, става ясно, че в групата на РД, дяловете на тежките и средно тежките заболявания са равни (Фиг.11).



Фигура 11. Дялове на заболяванията, установени в групата на РД, според типа на тяхната тежест

При ограничаване на анализа до тежки и много тежки заболявания, какъвто е подходът при често използваните панели за РСН, дялът на РД в изследваната от нас кохорта, би намалял от 9% до 3%. Това е трикратно редуциране на установения РР. Както става ясно, свеждането на анализа единствено до състояния с висок клиничен ефект, води до значително по-нисък дял на идентифицираните РД. За разлика от това, екзомният, широкообхватен подход позволява по-пълна оценка на репродуктивния риск и подпомага подобряването на индивидуализираното ГК и информиран репродуктивен избор.

От общия брой на откритите от нас заболявания сред РД, 62% ($n=5/8$) присъстват в групата на най-честите за изследваната кохорта и съответно 38% ($n=3/8$) или 1/3, не фигурират в посочената група (Фиг.12).



Фигура 12. Дялове на заболяванията, установени в групата на РД, според тяхната честота в рамките на изследваната кохорта

Фактът, че повечето заболявания, асоцииращи с РД, са свързани с най-често срещаните гени в кохортата, е очакван и отразява непропорционалния принос на честите носительства към комбинирания РР. Същевременно наличието на РД, свързани с по-редки състояния, демонстрира, че клинично значимият РР не се изчерпва с ограничен набор от често срещани състояния. Това наблюдение подкрепя приложимостта на екзомния подход за идентифициране на рискове извън обхвата на стандартните панели, особено в контекста на индивидуализирано ГК.

5. Оценка на случаите с патогенни варианти, имащи отношение към личния здравен риск на носителите

5.1 Обща характеристика

В настоящото проучване, в 13% ($n=38/300$) от участниците се установиха варианти, които имат отношение към личния здравен риск на изследваното лице. Тези находки бяха подразделени в категории според характера и степента на личния риск, както следва: доказан личен здравен риск (13%; $n=5/38$); потенциален личен здравен риск, изискващ допълнително генетично изследване (3%; $n=1/38$); условен личен здравен

риск, включващ генетично предразположение към онкологични заболявания (66%; n=25/38) и условен риск за клинична изява при МЗ със смесен тип на унаследяване (18%; n=7/38) (Фиг.13).



Фигура 13. Дялове на различните категории на личен здравен риск

5.2 Случаи с доказан личен здравен риск

Към първата категория се причислиха четири случая на мъже, при които е открит един и същ ПВ в *G6PD* гена – с.653C>T (p.Ser218Phe). Както вече се спомена, посоченият ген асоциира с дефицит на глюкозо-6-фосфат дехидрогеназа, фармакогенетичен дефект с ХР тип на унаследяване. Това определя реален риск от клинична изява, свързана с хемолитични епизоди при експозиция на оксидативен стрес, включително медикаменти, инфекции и определени храни. Препоръките при тези индивиди се свеждат до избягване на медикаменти с оксидативен потенциал (напр. сулфонамиди, антималярийни средства, някои антибиотици и аналгетици), консумацията на фава боб, както и до повишена клинична бдителност при инфекции. Не се обсъжда риск за преките потомци от мъжки пол на хемизиготните мъже. Въпреки това следва да се отбележи, че всички техни дъщери биха били хетерозиготни носителки, което определя 50% риск за клинична изява при техните синове (внуците от мъжки пол на посочените мъже).

Към категорията с доказан личен здравен риск се отнася един случай на мъж, при който беше установен категорично патогенен вариант в *ABCD1* гена – с.593C>T (p.Thr198Met). Вариантът е идентифициран при индивиди с клинични и/или биохимични прояви на Х-свързана адренолевкодистрофия (PS4). Налице са данни за сегрегацията му с болестта в засегнати фамилии (PP1). Вариантът отсъства в популационните бази данни,

включително gnomAD (PM2). Аминокиселинният остатък p.Thr198 представлява клинично значим и функционално важен регион на ABCD1 протеина, като други патогенни варианти, засягащи същия остатък, са описани в литературата (PM1). In silico и структурно-функционално моделиране подкрепят увреждащ ефект на варианта върху функцията на ABCD1 протеина (PP3). Изложените данни позволяват p.Thr198Met да се класифицира като патогенен. Предвид XR тип на унаследяване на посочената адренолевкодистрофия, се счита, че мъжете хемизиготи имат реален риск от клинична изява. Към момента на анализа при индивида не се установява клинична симптоматика. Въпреки това заболяването се характеризира с вариабилна възраст на манифестация, включително възможност за късно начало, което не позволява рискът да бъде отхвърлен и налага клинично проследяване. Препоръките към изследваното лице се свеждат до провеждане на регулярно клинично и биохимично проследяване, поради възможността за късна манифестация на заболяването и обсъждане тестване на родственици по майчина линия. Поради XR механизъм на унаследяване, всички дъщери на засегнатия мъж ще бъдат хетерозиготни носителки, което определя индиректен PR за клинична изява при техните бъдещи синове.

5.3 Случай с потенциален личен здравен риск

Към втората категория се отнесе единствен случай на жена с открити два ПВ в *VSHE* гена – c.1253G>T (p.Gly418Val) и c.293A>G (p.Asp98Gly). Посоченият ген асоциира с фармакогенетичния дефект бутирилхолинестеразна недостатъчност и се унаследява по AR модел. Предвид факта, че клинична изява се наблюдава само при специфични обстоятелства, най-често при експозиция на естерни мускулни релаксанти или други холинестеразно-метаболизирани медикаменти по време на обща анестезия, и при липса на такива данни, не може да се определи дали двата варианта са в цис или транс конфигурация. С оглед на определяне клиничната значимост на двата варианта, препоръките се свеждат до провеждане на молекулярно фазиране за определяне на алелната им конфигурация.

5.4 Случаи с условен личен здравен риск

В 49% (n=147/300) от всички изследвани лица бе установен ПВ в ген със смесен тип на унаследяване (AR и АД). От всички 59 гена, асоцииращи едновременно с рецесивни и доминантни фенотипи, 22% (n=13/59) са свързани с предразположение за

онкологични заболявания, а останалите 78% (n=46/59) – с МЗ. Тези находки определиха следващите две категории на случаи с варианти, имащи отношение към личния здравен риск на носителя.

5.4.1 Случаи с предразположение към онкологично заболяване

Към групата на случаи с ПВ в гени с предразположение към рак (установени от нас в 13 гена) се причисляват 25 индивида (Табл.20).

Таблица 20. ПВ, асоцииращи с предразположение за онкологично заболяване

Ген	Транскрипт	Вариант	Брой индивиди
<i>RAD50</i>	NM_005732.4	c.326_329del (p.Thr109AsnfsTer20)	5
<i>ERCC2</i>	NM_000400.5	c.1703_1704del (p.Phe568TyrfsTer2)	3
	NM_000400.5	c.1418dup p.(His474ProfsTer27)	1
<i>FANCL</i>	NM_018062.5	c.2T>Cp.?	3
<i>ATM</i>	NM_000051.4	c.1564_1565del p.(Glu522IlefsTer43)	1
	NM_000057.4	c.217C>T (p.Arg73Cys)	1
<i>BLM</i>	NM_020937.6	c.1642C>T (p.Gln548Ter)	2
<i>FANCM</i>	NM_006231.3	c.5048_5052del p.(Lys1683ArgfsTer3)	1
	NM_032043.4	c.2953del p.(Glu985ArgfsTer3)	1
<i>POLE</i>	NM_005213.4	c.6433C>T p.(Arg2145Ter)	1
	NM_000124.4	c.5484del p.(Ser1829ProfsTer16)	1
<i>BRIP1</i>	NM_001018113.3	c.2010dup (p.Glu671Ter)	1 (установен при носител на ПВ в <i>BLM</i> гена)
<i>ERCC4</i>	NM_178031.3	c.2395C>T (p.Arg799Trp)	1
<i>ERCC6</i>	NM_032444.4	c.1397+8147_1397+8150del	1
<i>FANCD2</i>	NM_000400.5	c.3707G>A (p.Arg1236His)	1
<i>FANCE</i>	NM_018062.5	c.1239dup (p.Pro414SerfsTer54)	1
<i>SLX4</i>	NM_000051.4	c.2808_2809del (p.Ala938ThrfsTer7)	1

Оценката на личния здравен риск беше извършена въз основа на публикувани данни за пенетрантност и относителен риск за съответния ген, както и съобразно типа на

варианта и модела на унаследяване. При интерпретацията бяха отчетени и индивидуални фактори като възраст, фамилна анамнеза и наличните клинични данни.

5.4.2 Условен риск за изява на доминантен фенотип, при носителство на патогенен вариант в ген за моногенно заболяване със смесен тип на унаследяване

При 121 индивиди от изследваните в настоящото проучване бе установено носителство на ПВ в общо 46 гена за МЗ с доминантен и рецесивен фенотип. Оценката на личния здравен риск беше извършена чрез интегриране на данни за възрастта на клинична изява, тежестта на заболяването и наличната литература за конкретния вариант, както и фамилна анамнеза. При новите ПВ, интерпретацията се основаваше на тяхната молекулна характеристика и съответствие с патогенния механизъм, свързан с доминантния фенотип. В никой от случаите нямаше данни за фамилност в контекста на съответното състояние. При 60 от изследваните лица не беше установен повишен риск за клинична изява, поради възраст, надхвърляща типичния период на фенотипна манифестация В 4 от случаите, доминантният фенотип се свежда до асимптоматично състояние. В 22 от случаите откритият ПВ, не е докладван в контекста на доминантна клинична проява. В 15 от случаите, макар ПВ да е докладван, информацията относно асоциацията му с доминантен фенотип е оскъдна или липсваща. В тези случаи рискът бе отхвърлен поради несъответствие между молекулната му характеристика и патогенния механизъм на доминантния фенотип. В 13 от случаите се касае за нов, недокладван ПВ, чиято молекулна характеристика не съвпада с патогенния механизъм на доминантния фенотип. В 7 от изследваните лица бе установен условен риск за клинична изява при моногенни заболявания със смесен тип на унаследяване (Табл.22).

С оглед прецизиране на личния здравен риск при всеки от седемте индивида, беше препоръчан сегрегационен анализ, с цел уточняване на клиничната значимост на установените варианти.

Таблица 21. ПВ, асоцииращи с условен риск за доминантен фенотип

Ген	Доминантен фенотип	Транскрипт	Вариант	Тип на варианта	Описание
<i>ALG8</i>	Болест на поликистозен черен дроб 3 с или без бъбречни кисти	NM_024081.4	c.1090C>T (p.Arg364Ter)	Stop gained	Докладван в хетерозиготно състояние в пациенти с доминантен фенотип. Молекулната характеристика съвпада с патогенния механизъм – LOF.
		NM_024081.4	c.174+1G>T	Splice donor	Нов, недокладван вариант, чиято молекулна характеристика съвпада с патогенния механизъм на доминантния фенотип – LOF.
<i>DSG2</i>	Аритмогенна деснокамерна хиперплазия 10	NM_001943.5	c.3G>A	Initiator codon (ATG) loss	Докладван в хетерозиготно състояние в пациенти с доминантен фенотип.
<i>MME</i>	Болест на Charcot–Marie–Tooth тип 2Т (аксонална невропатия с късно начало)	NM_007289.4	c.1408G>T (p.Glu470Ter)	Stop gained	Нов, недокладван вариант, чиято молекулна характеристика съвпада с патогенния механизъм на доминантния фенотип.
<i>MYH11</i>	Фамилна торакална аневризма на аортата 4	NM_002474.3	c.3757AAG[3] (p.Lys1256del)	Inframe deletion	Докладван в хетерозиготно състояние в пациенти с доминантен фенотип. Молекулната характеристика съвпада с патогенния механизъм доминантно негативен.
<i>PLG</i>	Наследствен ангиоедем 4	NM_000301.5	c.988A>G (p.Lys330Glu)	Missense	Докладван в хетерозиготно състояние в пациенти с доминантен фенотип.
<i>POGLUT1</i>	Болест на Dowling-Degos 4	NM_015560.3	c.394C>T (p.Arg132Ter)	Stop gained	Молекулната характеристика съвпада с патогенния механизъм – LOF.

6. Изграждане на подход за генетично консултиране при разширен скрининг за носителство, насочен към оценка на репродуктивния риск при двойки и към интерпретация на находки, имащи отношение към личния здравен риск на носителя

6.1 Генетично консултиране при скрининг за носителство

СН, като генетично изследване, следва да бъде съпътстван от ГК съгласно препоръките на международните професионални организации. Поради комплексния характер на генетичната информация и потенциалните ѝ последици, ГК в контекста на СН следва да се осъществява от компетентен и адекватно обучен специалист. В съответствие с утвърдената международна практика, прилагането на СН е всеобщо прието да бъде съпътствано от консултация, преди (първична) и след (вторична) извършване на генетичното изследване.

Първична консултация

Предтестовото генетично консултиране при СН включва подробно информиране на изследваните лица относно същността, целта и обхвата на изследването, както и възможните резултати, ограниченията на използваните генетични методи и наличието на остатъчен риск при отрицателен резултат. В рамките на консултацията следва да се разясни значението на носителския статус като често срещано явление в популацията, което обикновено не е свързано с клинична изява при носителя. Подчертава се, че има значение за РР в случай на съвпадение в носителството при двамата партньори в ген за APC или при носителство от страна на жената партньор в ген за ХРС. Обсъжда се и възможността за установяване на находки, свързани с личния здравен статус на носителя. Важна част от консултирането е снемането на лична, фамилна и репродуктивна анамнеза.

Генетичен тест

Екзомното секвениране и клиничният екзом осигуряват значително по-широк диагностичен обхват в сравнение с таргетните панели, като позволяват едновременно изследване на голям брой гени, асоцииращи с РС, и идентифициране на носителство за редки състояния, които биха останали недиагностицирани при ограничени панели. Това

повишава клиничната ефективност на СН и подобрява идентифицирането на РД. Едновременното изследване на двамата партньори допълнително оптимизира процеса чрез по-бързо и прецизно установяване на реалния РР.

Вторична консултация

Посттестовата ГК включва интерпретация на получените от генетичния тест резултати, обсъждане на възможностите за репродукция, както значението на ПВ с отношение към личния здравен риск (в случай, че такива са открити).

За двойките, при които не е установен повишен риск за РС в потомството, препоръките се свеждат до общопопулационните профилактични мерки преди и по време на бременност.

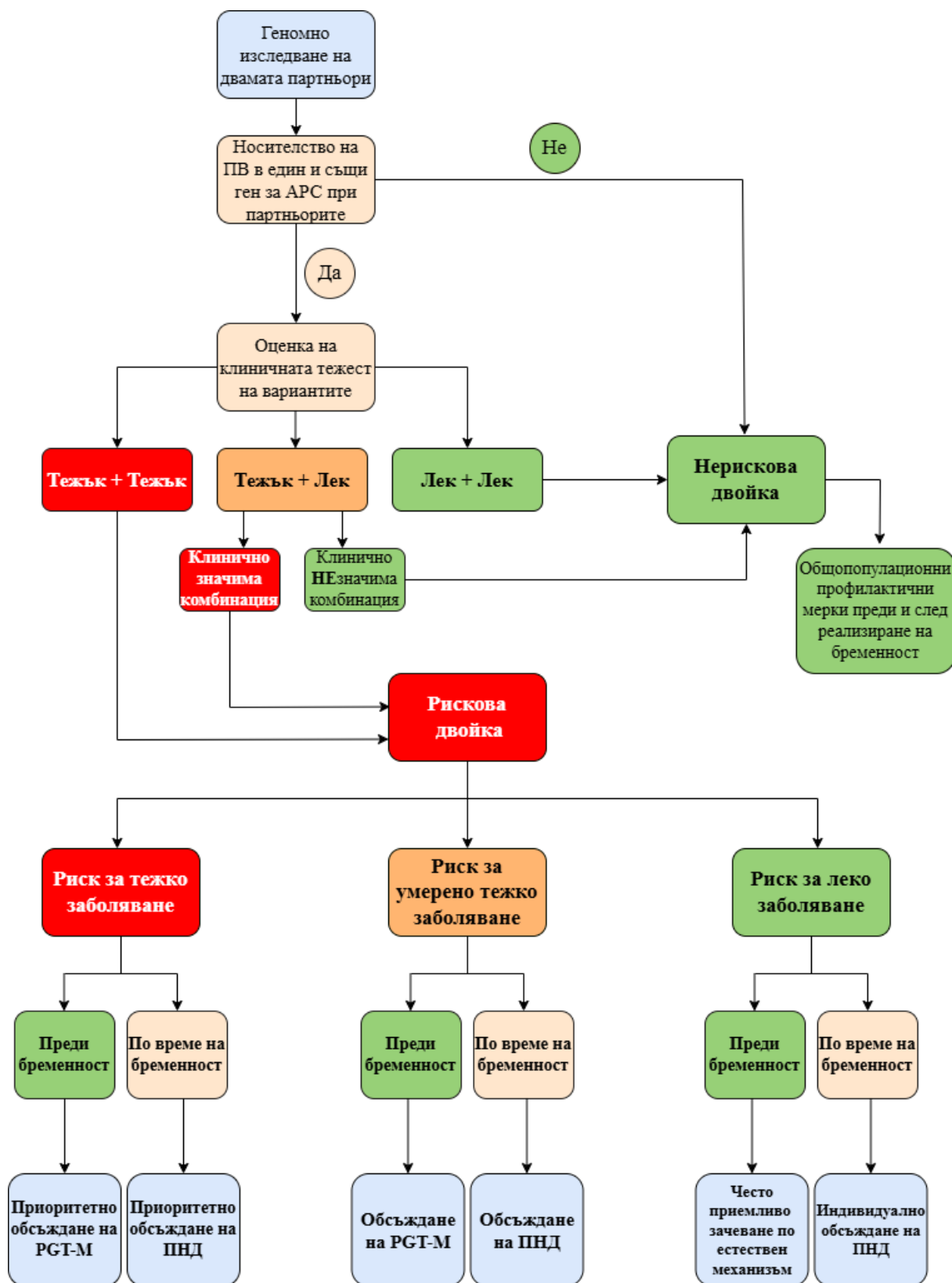
6.2 Подход за генетично консултиране при разширен скрининг за носителство, насочен към репродуктивния риск на изследваната двойка

При установяване на носителство на клинично значими варианти в един и същ ген при двамата партньори, ключов етап на ГК е **детайлната оценка на молекулната характеристика на вариантите**, тъй като самото съвпадение на носителството не е достатъчно за определяне на двойката като рискова. Реалният РР зависи от типа и функционалната значимост на вариантите, тяхната генотип–фенотип корелация и възможната клинична изява при потенциален хомозиготен или компаунд хетерозиготен генотип. Наличието на хипоморфни варианти или такива, асоцииращи с леки фенотипи, може съществено да промени оценката на риска. Съгласно насоките на ACMG, за оценка на РР следва да се вземат предвид само патогенни и вероятно патогенни варианти, докато вариантите с неясно клинично значение не се използват за клинични или репродуктивни решения. При доказана РД, **ГК следва да бъде структуриран и недирективен процес, съобразен с клиничната тежест на съответното заболяване и времето на установяване на риска**. Оптималният период за идентифициране на рисковия статус е предконцепционният, когато са налични най-широки репродуктивни възможности (Табл.22). Репродуктивната анамнеза също има значение, особено при наличие на предходни репродуктивни неудачи и планиране на асистиран репродуктивни техники.

Таблица 22. Сравнение между предконцепционно и пренатално установяване на РР

Аспект	Предконцепционно установяване на риска	Установяване на риска по време на бременност
Наличие на времеви натиск	Липсва или е минимален (в случай на напреднала възраст на един или и двамата партньори)	Изразен, обвързан със срокове за диагностика и вземане на решения
Репродуктивни възможности	Пълен набор от опции: естествено зачеване с ПНД, PGT-M, донорски гамети, отказ от биологична репродукция	Ограничен набор от опции, основно свързани с пренатална диагностика и последващи решения
Характер на генетичното консултиране	Подробно, планирано, с възможност за многократни срещи	По-концентрирано във времето, с необходимост от бърза и ясна комуникация
Психологически аспект	По-ниско ниво на емоционално напрежение	Повишено емоционално натоварване и необходимост от подкрепа
Автономност на решенията	Максимално подпомогната	Ограничена от времеви и емоционални фактори
Организационни възможности	Възможност за насочване към специализирани центрове и планиране на стратегията	Ограничени, често паралелно с хода на бременността
Роля на генетичното консултиране	Оптимално управление на репродуктивния риск	Управление на вече наличен риск и подпомагане на решения в кратки срокове

Подходът за ГК по отношение РР за APC на изследваната двойка върху резултати от РСН е представен на Фигура 14.



Фигура 14. Подход за генетично консултиране върху резултати от разширен скрининг за носителство, по отношение репродуктивния риск на двойката

6.3 Подход за генетично консултиране при находки, свързани с личния здравен риск на изследвания индивид

При установяване на генетични находки, които надхвърлят РР и имат потенциално значение за личния здравен статус на изследвания индивид. Подходът към такива резултати изисква внимателна интерпретация, ясно разграничаване на степента на риска и индивидуализирано ГК. В зависимост от характера и клиничната значимост на находката, предлагаме тези случаи условно да бъдат групирани в няколко основни категории.

Следва да се подчертае, че предоставянето на резултати, имащи значение за личния здравен риск, се извършва единствено при изрично заявено желание от страна на изследваното лице.

1. Доказан личен здравен риск

Към тази категория се отнасят находки, при които е налице ясна и добре установена асоциация между открития патогенен вариант/и генотип и повишен риск за клинична изява при носителя. В тези случаи ГК е насочено към информирание за естествения ход на състоянието, наличните възможности за профилактика, проследяване или лечение, както и към насочване за подходящо клинично наблюдение и консултации със съответните специалисти. Подходът следва утвърдените клинични ръководства и препоръки за управление на съответния риск.

2. Потенциален личен здравен риск, изискващ допълнителна генетична характеристика

В тази група попадат находки, при които съществуват данни за възможна връзка с повишен здравен риск, но информацията е недостатъчна за категорично заключение и се изисква провеждане на допълнителни генетични анализи. ГК в тези случаи има за цел да разясни степента на несигурност, необходимостта от допълнителни изследвания и времевия хоризонт за преоценка на риска.

3. Условен личен здравен риск, включващ генетично предразположение към онкологични заболявания

Тази категория обхваща находки, свързани с предразположение към ракови заболявания, при които рискът за клинична изява е условен и зависи от множество

фактори, включително пенетрантност на гена, възраст на изследваното лице, фамилна анамнеза и влияние на средови фактори. ГК отново е насочено към интерпретация на риска в индивидуален контекст, обсъждане на препоръки за проследяване и профилактика и предотвратяване на свръхинтерпретация или неоправдано безпокойство.

4. Условен риск за клинична изява при моногенни заболявания със смесен тип на унаследяване (АР/АД)

Най-специфичната и комплексна група включва находки в гени, асоцииращи с МЗ, при които са описани както АР, така и АД форми. При тези случаи откриването на ПВ в контекста на СН, налага прецизна оценка на риска за клинична изява при носителя, като предлагаме поетапен аналитичен подход.

Първоначална и задължителна стъпка в интерпретацията е **оценка за наличие или липса на фамилност**, включително данни за клинична изява при родственици от първа и по-далечни степени.

При наличие на фамилност за доминантната форма на заболяването, рискът за клинична изява при носителя се счита за повишен. В този контекст ключово значение за прецизирането на индивидуалния риск има извършването на **сегрегационен анализ**. Посоченият анализ се изразява в насочено генетично изследване за конкретния вариант, (установен при лицето – обект на ГК), при родственици с клинична изява, съответстваща на разглежданото състояние. Целта е потвърждаване или отхвърляне на връзката между варианта и наблюдавания фенотип. Паралелно с това се препоръчва активен консултативен и проследяващ подход, включващ разширена клинична оценка и насочване към съответния специалист.

При липса на данни за фамилност или в случай, че след провеждане на сегрегационен анализ не се установява корелация между варианта и фенотипа на засегнатия родственик, подходът е аналогичен. **Рискът за клинична изява може да бъде отхвърлен в следните ситуации:**

- При индивиди, чиято възраст надхвърля типичния период за проява на доминантния фенотип;
- Когато откритият ПВ асоциира само с рецесивен фенотип;
- Когато вариантът е докладван, но наличната информация за асоциацията му с доминантен фенотип е оскъдна или липсваща, се разглежда молекулната му

характеристика. В случай, че не съответства на патогенния механизъм на доминантната форма на заболяването, рискът се отхвърля. Например, установен е вариант, чийто ефект е LOF (фреймшифт, нонсенс, сплайс вариант), в ген при който доминантната проява се обуславя от придобиване на функция или доминантно негативен ефект. При обратния сценарий – вариант с придобиване на функция (миссенс) при ген, чийто доминантен фенотип се дължи на хаплонедостатъчност.

- При нов, недокладван вариант, чиято молекулна характеристика не съвпада с патогенния механизъм, описан за доминантния фенотип.

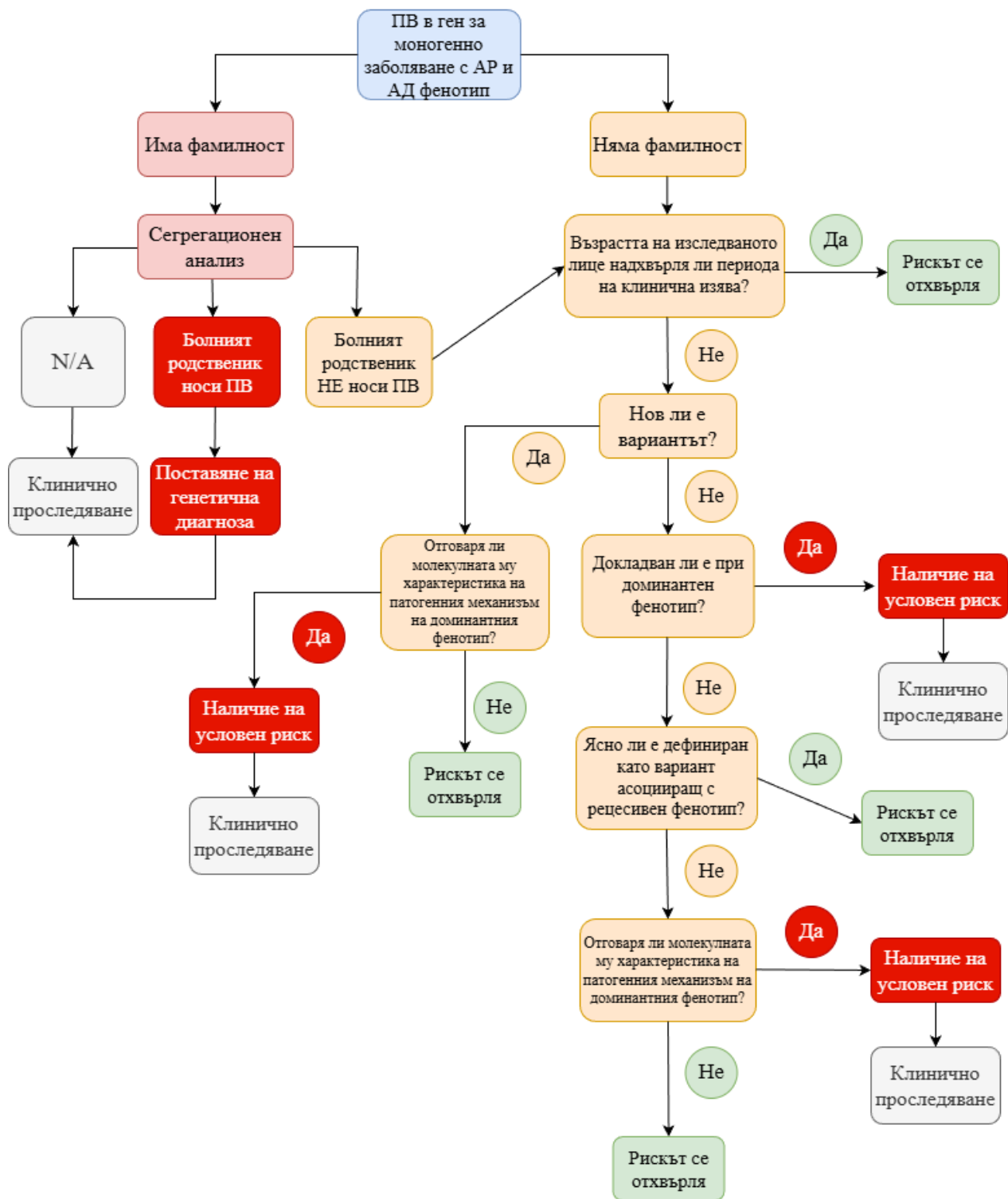
В тези случаи рискът за клинична изява при носителя се приема за нисък или несъществен, като ГК е насочено към разясняване на резултата, предотвратяване на неправилна интерпретация и осигуряване на възможност за последваща преоценка при наличие на нови данни.

Повишен риск се обсъжда, когато изявата на доминантния фенотип е в зряла възраст и:

- откритият вариант асоциира с доминантен фенотип;
- откритият вариант (нов или с оскъдни данни в литературата) е с молекулна характеристика, която съответства на патогенния механизъм на доминантния фенотип.

Следва да се отбележи, че условният риск не е еквивалентен на диагноза и не предполага неизбежна клинична изява, а представлява рамка за последващо проследяване и преоценка. Поведението в този случай се свежда до насочване за подходящо клинично проследяване, препоръки за периодична преоценка на генетичната находка при натрупване на нови научни и клинични данни, както и обсъждане на възможността за допълнителни изследвания или консултации със съответните клинични специалисти, когато това е приложимо. ГК в тези случаи има за цел да предотврати както подценяване, така и свръхинтерпретация на риска, като запази принципите на недирективност и информиран избор.

Подходът за ГК при наличие на ПВ в ген за МЗ със смесен тип на унаследяване е представен на Фигура 15.



Фигура 15. Подход за генетично консултиране при наличие на патогенен вариант в ген, едновременно асоцииращ с рецесивен и доминантен фенотип и оценка на личния здравен риск на носителя

ОБОБЩЕНИЕ НА НАСТОЯЩОТО ПРОУЧВАНЕ

В съвременния свят, рецесивните МЗ представляват съществен медицински и социален проблем поради своята честота в популацията, ранна изява и потенциално тежко клинично протичане. Макар отделните заболявания да са редки, кумулативният им ефект е значим, тъй като носителството на ПВ в гени за РС е широко разпространено. Именно това обуславя ключовата роля на РСН като инструмент, който допринася за ограничаване на неблагоприятните репродуктивни последици чрез идентифициране на случаите с повишен риск и подпомагане автономията на двойките чрез информирано репродуктивно планиране.

В настоящото проучване установихме, че приблизително 96% от изследваните от нас индивиди (n=287/300), бяха носители ПВ в поне един ген, асоцииращ с РС. Високият дял на намерено носителство е обяснимо предвид широките възможности за детекция на използваната методика - NGS с клинично-екзомен панел. От друга страна, той потвърждава, че носителството следва да се разглежда по-скоро като норма, особено по отношение на определени РС в конкретни популации.

В рамките на кохортата бяха идентифицирани общо 690 различни ПВ, разпределени в 481 гена, асоцииращи с РС. Приблизително една трета, 32% (n=220/694) от установените варианти представляваха нови, недокладвани към момента на анализ, в клинични и популационни бази данни. Този резултат подчертава високата степен на генетична хетерогенност на българската популация, както и ограничената представеност в международните референтни ресурси. Едно временно с това се затвърждава и диагностичния потенциал на екзомно-базирания подход за идентифициране на редки варианти.

В настоящото проучване се очертават два основни интерпретационни проблема. От една страна, идентифицирането на РД за APC не може да се основава единствено на съвпадение на носителство на ПВ в един и същ ген в двама партньори, а изисква детайлна оценка на молекулната характеристика на вариантите, включително техния функционален ефект, пенетрантност и асоциирана клинична тежест. Това се илюстрира ясно от получените в настоящото изследване данни, при които първоначално като потенциално рискови бяха идентифицирани 11% (n=17/150) от репродуктивните двойки въз основа на съвпадение на носителство. След последваща оценка на клиничната

значимост и тежест на установените варианти при всяка двойка, броят на действителните репродуктивно рискови двойки се редуцира до 9% (n=13/150).

От друга страна, екзомно-базираният СН неминуемо води до установяване на генетични находки с потенциално значение за личния здравен риск на носителя, които излизат извън първоначалната репродуктивна цел на изследването и поставят допълнителни клинични и етични предизвикателства. В подкрепа на това, в настоящото проучване при 13% (n=38/300) от изследваните лица беше идентифицирана находка с отношение към личния им здравен статус. Най-голям дял от тези находки се отнася до предразположение към онкологично заболяване – 66% (n=25/38). При 18% (n=7/38) от лицата се установи условен риск за доминантна клинична проява на МЗ, асоцииращо с ген със смесен модел на унаследяване (АР/АД), докато при 13% (n=5/38) беше налице доказан личен здравен риск. В единичен случай (3%, n=1/38) беше идентифицирана находка с потенциално значение за личния здравен риск, изискваща допълнително генетично изследване за уточняване на клиничната ѝ значимост. Тези резултати илюстрират, че екзомно-базираният подход разширява значително обхвата на генетичната информация отвъд РР и налага интегриран подход при интерпретацията и ГК.

V. ИЗВОДИ

1. Честотата на носителство на ПВ в гени, асоцииращи с РС, установена в група индивиди от българската популация е 96%, т.е. приблизително всеки изследван индивид е носител на вариант в поне един ген за РС; при среден брой на носителства (носителски товар) от 3,5 ПВ/на индивид. Високата степен на открито носителство подвърждава предимствата на използваната методика – NGS с клинично-екзомен панел, за по-пълна детекция на генетични варианти, в рамките на СН.
2. Преобладаващата част 92% от засегнатите гени (асоцииращи с РС) имат характер на редки, а 8% – съответстват на дефиницията за често засегнати (носителство при ≥ 5 индивида и честота $\geq 1:60$). Клиничните състояния, асоцииращи с втората група носителства, се считат за чести заболявания, като по-голямата част 2/3 от тях се характеризират като леки или умерено тежки в протичането си. Това потвърждава хипотезата, че много от тежките генетични състояния са подложени на отрицателен селекционен отбор, което води до по-ниската им популационна разпространеност.
3. Анализът на молекулната характеристика на ПВ, в най-често засегнатите гени, разкрива значителна хетерогенност, включваща както варианти с ясно изразен патогенен ефект, така и хипоморфни и контекст-зависими. Макар да преобладаваха вариантите с тежък клиничен ефект (48%), в изследваната кохорта тяхната честотата на носителство беше приблизително еднаква с тази за леките варианти.
4. Около 1/3 от откритите ПВ представляват нови, недокладвани към момента на анализа варианти. Това подчертава високата диагностична и научна стойност на NGS метода за идентифициране на редки и до момента неописани варианти със значение за репродуктивния и личния здравен риск.
5. От всички включени в проучването двойки – 11 % бяха определени първоначално като потенциално рискови – т.е. комбинацията от установените генетичните варианти на двамата партньори предполага значително повишен РР за генетично заболяване на потомството. След допълнителен анализ, въз основа на конкретната молекулна и клинична информация за варианта, делът на двойките с реален РР се редуцира до 9%.

6. В групата на двойките с реален РР, в 62% от тези случаи се касае за състояние с умерено тежко клинично протичане. При 77% от тях, засегнатият ген (и съответният фенотип) - обект на анализа, се пречислява в групата на рядко засегнати гени, т.е. може да бъде пропуснат при СН, ако не се прилага екзомно-базиран подход. Това определя значението на този клинично ориентиран подход за прецизна оценка на РР.
7. При 13% от изследваните лица беше установена находка, с отношение към техния личен здравен статус - предимно (66% от тези случаи) по отношение предразположение към онкологично заболяване и в по-малък дял (18%) с условен риск за доминантна проява на МЗ (при ген със смесен модел на унаследяване АР/АД).
8. Екзомно секвениране (клиничен екзом) с едновременно тестване на двамата партньори се утвърждава като най-оптимална стратегия при СН, предвид изразената генетична хетерогенност на българската популация.
9. Генетичното консултиране е процес неизменно свързан със СН, както предтестово така и посттестово. При 21% от изследваните индивиди, проведеният СН е установил находки/ПВ, имащи отношение към техния репродуктивен или личен здравен риск, като тази клинично значима здравна информация е осигурена в рамките на специализирана ГК.
10. Разработен е комплексен подход за ГК при РСН, в който ролята на генетичния консултант е ключова във всички етапи на този процес. Той започва от първичния контакт с двойката (информация относно теста, генеалогия), преминава през експертиза върху резултатите от теста (молекулна и клинична интерпретация, оценка на реалния репродуктивен и личен здравен риск) и завършва с обсъждане на рисковете, препоръки и подпомагане на двойката за информиран и автономен избор, относно тяхната репродукция.

VI. ПРИНОСИ

Приноси с научен и оригинален характер

1. За първи път в България е направено комплексно проучване върху проспективно проведен СН сред двойки от българската популация. Проучването е реализирано по единен и стандартизиран протокол и базирано на разширен генен панел от 6699 гена с прилагане на NGS технология, което осигурява високочувствителна оценка на носителството на ПВ в гени за РС.
2. Представени са нови данни, относно честота на носителство, профил на засегнатите гени и спектър на ПВ в изследвана кохорта от българската популация, които ще допълнят съществуващите до момента ограничени данни за България.
3. Установен е голям брой от нови варианти, които понастоящем не са докладвани и ще обогатят националните и световните бази данни.
4. Потвърдена е ролята на СН, с използване на NGS технология с клиничен екзом, за идентифициране на нови или редки ПВ с потенциално значение както за репродуктивния, така и за личния здравен риск на носителите.

Приноси с приложен характер

1. Установява се, че предвид генетичната хетерогенност на българската популация, прилагането на РСН с клиничен екзом представлява оптимална стратегия за идентифициране на носителството на ПВ в гени за РС.
2. Изграден е подход за оценка на репродуктивния риск за РС въз основа на резултатите от СН, както и за генетично консултиране при такива двойки.
3. Изграден е подход за оценка на находки/ПВ, които имат отношение към личния здравен риск на носителя, както и за генетично консултиране при тези индивиди.
4. Разработен е комплексен подход за ГК при РСН, който започва от първичния контакт с двойката (информация относно теста, генеалогия), преминава през експертиза върху резултатите от теста (молекулна и клинична интерпретация, оценка на реалния репродуктивен и личен здравен риск) и завършва с обсъждане на рисковете, препоръки и подпомагане на двойката за информиран и автономен избор, относно тяхната репродукция.

VII. ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ПРОЯВИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Публикации:

- Kovacheva KS, **Nikolova SE**, Kamburova ZB. Carrier screening for single-gene disorders – A brief review. *Journal of Biomedical and Clinical Research*, 2021, 14(2):105–116; DOI: 10.2478/jbcr-2021-0015.
- **Nikolova SE**, Kamburova ZB, Vasilev PP, Kovacheva KS, Yordanova IA. Autosomal recessive type of dystrophic epidermolysis bullosa with a novel variant in the COL7A1 gene. *Biomedical Reports*, 2024, 21(5):167; DOI: 10.3892/br.2024.1855; PMID: 39301563; PMCID: PMC11411400; Web of Science (ESCI) / Scopus.
- Kamburova ZB, Dimitrova PD, Dimitrova DS, Kovacheva KS, Popovska SL, **Nikolova SE**. Lynch-like syndrome with germline WRN mutation in Bulgarian patient with synchronous endometrial and ovarian cancer. *Hereditary Cancer in Clinical Practice*, 2023, 21(1):13; DOI: 10.1186/s13053-023-00257-1; PMID: 37452354; PMCID: PMC10349469; Web of Science / Scopus.

Участия в научни форуми:

- **Nikolova S**, Kovacheva K, Kamburova Z. Carrier screening: a pilot study amongst a Bulgarian population. *Jubilee Scientific Conference with International Participation “50 Years of Medical Education and Science in Pleven”*, 01–03 November 2024.
- **Nikolova S**, Kovacheva K, Kamburova Z, Ivanova M, Stankov I. Variant c.895_904del (p.Val301SerfsTer8) in a newborn girl with isolated postaxial polydactyly – a case report. *European Human Genetics Conference 2023*, Glasgow, Scotland, UK, 10–13 June 2023.
- **Николова С**, Ковачева К, Камбурова З, Иванова М, Станков И. Роля на геномните изследвания при пренатално установена бъбречна поликистоза на плода. *Трета научна конференция „Генетика в клиничната практика“*, хотел Белвил, Дюни, 25–28 май 2023.